

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

SEDE QUITO

CARRERA:

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de: INGENIERAS EN

BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

TEMA:

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS ETANÓLICOS Y ACUOSOS

DE HOJAS SENESCENTES DE *Terminalia catappa* Y LA ACTIVIDAD

INHIBITORIA SOBRE *Edwardsiella tarda*.

AUTORAS:

FRANCESCA ANTONELLA CAZAR HIDALGO

ALEXIA ROSSIBEL TOLEDO AGUILAR

DIRECTOR: CHRISTIAN LARENAS URÍA

Quito, agosto del 2021

CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR

Nosotras Francesca Antonella Cazar Hidalgo, con documento de identificación N° 1753178696 y Alexia Rossibel Toledo Aguilar con documento de identificación N° 0704679430, manifestamos nuestra voluntad y cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autoras del trabajo de titulación intitulado: “Actividad antioxidante de extractos etanólicos y acuosos de hojas senescentes de *terminalia catappa* y la actividad inhibitoria sobre *edwardsiella tarda*”, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingenieras en Biotecnología de los Recursos Naturales, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en nuestra condición de autoras nos reservamos los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribimos este documento en el momento que hacemos entrega del trabajo final en digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.



Nombre: Francesca Antonella Cazar Hidalgo

Cédula: 1753178696



.....

Nombre: Alexia Rossibel Toledo Aguilar

Cédula: 0704679430

Declaratoria de coautoría del docente tutor/a

Yo, declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación “Actividad antioxidante de extractos etanólicos y acuosos de hojas senescentes de *Terminalia catappa* y la actividad inhibitoria sobre *Edwardsiella tarda*” realizado por Francesca Antonella Cazar Hidalgo y Alexia Rossibel Toledo Aguilar obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana para ser considerados como trabajo final de titulación.

Quito, agosto de 2021



Christian F. Larenas Uría

Tutor

Dedicatoria

A Margarita, Pepe, Roger, Kleyner, Leyster y José Luis, mi preciada familia, por enseñarme a soñar sin que los sueños me dominen.

Alexia

A mis padres Fausto y María de Lourdes y a mis abuelitos Augusto y Rosina por ser mi apoyo incondicional y por ser mi mayor fuente de motivación para alcanzar todas mis metas y sueños.

Antonella

Agradecimientos

A mi familia, por estar en todos los momentos.

A nuestro tutor, Christian Larenas, por su paciencia, ayuda y serenidad.

A mi querida compañera, Anto, por su gran apoyo, por convertir los obstáculos en algo mucho más fácil y divertido.

A los amigos que hice durante el camino, a los técnicos del laboratorio, a la universidad, que, de una u otra manera, extendieron su mano para ayudar.

Alexia

Agradecimientos

Agradezco a Dios por mantenerme con bien, guiar mis pasos en el camino y permitirme continuar con mis estudios frente a cualquier adversidad que se haya presentado.

A mi padre Fausto por apoyarme en todo momento sin importar cuantas veces haya fallado siempre ha estado a mi lado para ayudarme a levantar. A mi madre María de Lourdes por su infinito cariño, comprensión, apoyo y sus palabras de aliento.

A mi hermana María Fernanda por ser un ejemplo para mí, por enseñarme muchas cosas valiosas y por brindarme su ayuda siempre que la necesité. A mi hermano Juan Pedro por apoyarme sobre todo en los momentos difíciles.

A mis abuelitos Augusto y Rosina, por sus sabios consejos, por su cariño y apoyo desde siempre.

A toda mi familia por aportar con su granito de arena en cualquier necesidad y por su gran cariño.

A Cristian Egüez por su apoyo, por acompañarme en todo el camino, por ayudarme a aprender todo lo que necesité.

A mi querida compañera y amiga Alexia por su comprensión y su ayuda para que todo el trabajo de investigación haya sido exitoso, por su amistad y cariño.

A nuestro tutor Christian Larenas y a todos los ayudantes del laboratorio por brindarnos su ayuda, en especial a Edison Osorio y a Nicolás Grijalva por sus buenos consejos y apoyo.

A mis compañeros que me brindaron su ayuda a lo largo de toda la carrera.

Antonella

Índice de contenido

1. Introducción	1
2. Marco conceptual.....	4
2.1 Almendro de la India (<i>Terminalia catappa</i>)	4
2.2 Metabolitos secundarios.....	5
2.2.1 Compuestos fenólicos	5
2.3 Extractos vegetales	7
2.3.1 Métodos de obtención de extractos vegetales	7
2.4 <i>Edwardsiella tarda</i>	7
2.4.1 Edwardsielosis	8
3. Metodología.....	9
3.2 Elaboración de extractos y cuantificación de fenoles totales por el método colorimétrico de Folin Ciocalteu.....	9
3.2.1 Extracción asistida por ultrasonido y cuantificación de fenoles	11
3.2.2 Extracción mediante Soxhlet y cuantificación de fenoles	14
3.2.3 Extracción mediante Maceración y cuantificación de fenoles	15
3.3 Tamizaje Fitoquímico	18
3.3.1 Ensayo de Dragendorff	19
3.3.2 Ensayo Cloruro Férrico	19
3.3.3 Ensayo Shinoda	19
3.4 Cuantificación de flavonoides totales por el método de cloruro de aluminio ..	20
3.5 Determinación de la actividad antioxidante	22

3.5.1	Método DPPH	22
3.5.2	Método ABTS	24
3.6	Identificación de flavonoides por Cromatografía de capa fina (TLC).....	25
3.7	Actividad inhibitoria por medio de la técnica de microdilución en caldo.	26
4.	Resultados y discusión	29
4.1	Elaboración de extractos y cuantificación de fenoles totales por el método colorimétrico de Folin Ciocalteu.....	29
4.1.1	Extracción asistida por ultrasonido y cuantificación de fenoles	29
4.1.2	Extracción mediante Soxhlet y cuantificación de fenoles	36
4.1.3	Extracción mediante maceración y cuantificación de fenoles	39
4.2	Tamizaje fitoquímico	42
4.3	Cuantificación de flavonoides totales por el método de cloruro de aluminio ..	43
4.4	Determinación de la actividad antioxidante	46
4.5	Identificación de flavonoides por cromatografía de capa fina (TLC)	48
4.6	Actividad inhibitoria por medio de la técnica de microdilución en caldo.	53
	Conclusiones.....	57
	Recomendaciones	59
	Referencias bibliográficas.....	60
	Anexos	64

Índice de tablas

Tabla 14 Clasificación taxonómica de <i>Terminalia catappa</i> L.	4
Tabla 2 Concentraciones para la sonicación en ultrasonido	12
Tabla 3 Preparación de soluciones para fenoles totales por extracción asistida de ultrasonido.	12
Tabla 4 Preparación de soluciones para fenoles totales de la extracción por Soxhlet.	14
Tabla 5 Preparación de soluciones para fenoles totales de la extracción por maceración	16
Tabla 6 Curva de calibración para flavonoides totales.	20
Tabla 7 Preparación de los extractos para flavonoides totales.	21
Tabla 8 Preparación de soluciones para la cuantificación de actividad antioxidante por DPPH.....	23
Tabla 9 Preparación de soluciones para la cuantificación de actividad antioxidante por ABTS.....	24
Tabla 10 Concentración de fenoles expresada en mg/100 g, en función del tiempo de extracción asistida por ultrasonido y de hojas senescentes.	30
Tabla 11 Concentración de fenoles expresada en mg/100 g en función de la composición del disolvente en la extracción asistida por ultrasonido de hojas senescentes.	31
Tabla 12 Concentración de fenoles expresada en mg/100 g, en función del tiempo de extracción asistida por ultrasonido y de hojas mezcladas.	33
Tabla 13 Concentración de fenoles expresada en mg/100 g en función de la composición del disolvente en la extracción asistida por ultrasonido de hojas mezcladas.	34

Tabla 14 Categorización de tratamientos de extracción mediante Soxhlet y cuantificación de la concentración de fenoles expresados en mg/100 g en hojas senescentes.	36
Tabla 15 Categorización de tratamientos de extracción mediante Soxhlet y cuantificación de la concentración de fenoles expresada en mg/100 g en la mezcla de hojas.	37
Tabla 16 Tabla resumen de concentraciones de fenoles expresados en mg/100 g del extracto de hojas mezcladas y senescentes en el día uno y día dos de maceración.	39
Tabla 17 Resultados del tamizaje fitoquímico de la maceración de los extractos etanólicos de hojas verdes y senescentes del almendro (<i>Terminalia catappa</i>).	42
Tabla 18 Cuantificación de la concentración de flavonoides totales, expresada en mg/g en hojas senescentes de <i>Terminalia catappa</i>	43
Tabla 19 Cuantificación de la concentración de flavonoides totales, expresada en mg/g en mezcla de hojas verdes y hojas senescentes de <i>Terminalia catappa</i>	44
Tabla 20 Resultados de la corrida cromatográfica expresados en valores de Rf del extracto de hojas senescentes de <i>Terminalia catappa</i>	49
Tabla 21 Resultados de la corrida cromatográfica expresados en valores de Rf del extracto de hojas mezcladas de <i>Terminalia catappa</i>	50
Tabla 22 Resultados de la corrida cromatográfica revelada con DPPH, expresados en valores de Rf del extracto de hojas senescentes de <i>Terminalia catappa</i>	52
Tabla 23 Resultados de la corrida cromatográfica revelada con DPPH, expresados en valores de Rf del extracto de hojas mezcladas de <i>Terminalia catappa</i>	52
Tabla 24 Datos de las diferentes concentraciones y absorbancias obtenidas en la microplaca.	54

Índice de figuras

Figura 1. Curva de calibración con ácido gálico	17
Figura 2. Distribución de la microplaca para evaluar la actividad inhibitoria de los extractos de hojas mezcladas y hojas senescentes de <i>Terminalia catappa</i>	28
Figura 3. Comparación de los resultados de la cantidad de fenoles de las hojas senescentes tras 120 minutos de exposición a ultrasonido a una concentración de 70 etanol:30 agua, entre los resultados de cantidad de fenoles de la mezcla de hojas tras 120 minutos de exposición a ultrasonido a una concentración de 50 etanol:50 agua.	35
Figura 4. Comparación de métodos de extracción para cuantificación de fenoles de los diferentes tipos de extractos de hojas de <i>Terminalia catappa</i>	41
Figura 5. Comparación de contenido de flavonoides en hojas senescentes y la mezcla de hojas verdes y senescentes de <i>Terminalia catappa</i>	45
Figura 6. Comparación del IC50 de DPPH de los extractos y del ácido ascórbico.....	46
Figura 7. Comparación del IC50 de ABTS de los extractos y del ácido ascórbico.....	47
Figura 8. Placa TLC de extracto de hojas senescentes (A) y hojas mezcladas (B) de <i>Terminalia catappa</i> , observada a 245 nm y a 366 nm.	49
Figura 9. Placa TLC con DPPH de extracto de hojas senescentes (A) y hojas mezcladas (B) de <i>Terminalia catappa</i> , observada a 245 nm y a 366 nm	51

Índice de anexos

Anexo 1. Tamizaje Fitoquímico. Pruebas Positivas	64
Anexo 2. Resultados del programa estadístico InfoStat	67
Anexo 3. Comparación del inóculo con la prueba de Mc Farland.	71

Resumen

Este proyecto investigativo presentó como propósito la evaluación del potencial antioxidante y la valoración de la actividad inhibitoria sobre *Edwardsiella tarda* de extractos hidroetanólicos de hojas de *Terminalia catappa*. Se comparó la actividad de los extractos de hojas exclusivamente senescentes con los extractos obtenidos de una mezcla colectada al azar de hojas verdes con senescentes. Para el progreso de la investigación, se preparó los extractos en diferentes proporciones Etanol/Agua utilizando tres técnicas diferentes: ultrasonido, soxhlet y maceración. Mediante el análisis estadístico de los resultados del ensayo de Folin Ciocalteu se determinó la proporción de disolventes y el método que producen la mejor extracción de fenoles para ser utilizados en las pruebas de capacidad antioxidante e inhibitoria. Se determinó que por el método de ultrasonido con las proporciones de etanol/agua 50:50 para hojas mezcladas y 70:30 para hojas senescentes se generó la mayor extracción de fenoles. Mediante el método DPPH se determinó que las hojas senescentes tienen un mayor poder antioxidante en comparación a las hojas mezcladas ya que se obtuvo un IC₅₀ de 58,40 ug/mL. Finalmente, mediante la aplicación de la técnica de microdilución se verificó que los extractos de *Terminalia catappa* tienen poder inhibitorio contra la bacteria *Edwardsiella tarda*, a la concentración de 17,20 mg/mL en el caso del extracto de hojas mezcladas y 39,91 mg/mL en hojas senescentes, concluyendo que las hojas senescentes presentaron mayor capacidad inhibitoria contra el patógeno en comparación con la mezcla que incluye hojas verdes.

Palabras clave: Antibacteriano, microdilución, maceración, fenoles, flavonoides.

Abstract

This research project presented as purpose the evaluation of the antioxidant potential and the evaluation of the inhibitory activity on *Edwardsiella tarda* hydroethanolic extracts of *Terminalia catappa* leaves. The activity of exclusively senescent leaves extracts was compared with extracts obtained from a randomly collected mixture of green and senescent leaves. For the progress of the investigation, the extracts were prepared in different Ethanol/Water ratios using three different techniques: ultrasound, soxhlet and maceration. By means of the statistical analysis of the results of the Folin Ciocalteu test, the proportion of solvents and the method that produced the best extraction of phenols to be used in the antioxidant and inhibitory capacity tests were determined. It was determined that by the ultrasound method with the proportions of ethanol/water 50:50 for mixed leaves and 70:30 for senescent leaves, the highest extraction of phenols was generated. Using the DPPH method, it was determined that senescent leaves have a higher antioxidant power compared to mixed laves, since an IC₅₀ 58,40 µg/mL was obtained. Finally, through the application of the microdilution technique, it was verified that the *Terminalia catappa* extracts have inhibitory power against the *Edwardsiella tarda*, at a concentration of 17, 20 mg/mL in the case of the mixed leaves extract and 39,91 mg/mL in senescent leaves, concluding that the senescent leaves has a higher inhibitory capacity against the pathogen compared to the mixture that includes green leaves

Keywords: Antibacterial, microdilution, maceration, phenols, flavonoids.

1. Introducción

El pescado es una fuente de proteínas y nutrientes de gran importancia en la alimentación humana al ser rico en vitaminas, minerales, ácidos grasos poliinsaturados y valor biológico (FAO, 2016), es consumido alrededor de todo el mundo y actualmente existe un consumo humano directo mayor al 77 % (FAO, 2020), es decir, representa una parte relevante de la dieta de los seres humanos (Novoslavskij, y otros, 2016).

En el transcurso de los años 1961-2017, el consumo total de pescado (3,1 %) incrementó de tal manera que superó la tasa de crecimiento de la población anual (1,6 %). Para 2017, en todo el mundo, el pescado comestible llegó a acaparar, aproximadamente, el 17 % de la proteína obtenida de animales, y, también, llegó a representar el 7 % del total de las proteínas que se consumen alrededor del mundo. Adicionalmente, el pescado proporcionó alrededor de un 20 % del aporte medio de proteínas animales per cápita a aproximadamente 3 300 millones de personas a nivel mundial (FAO, 2020).

Debido a la creciente demanda de proteínas de alta calidad, la reducción de la captura de peces silvestres y el avance de las tecnologías de cultivo de peces, se espera que la producción acuícola mundial se duplique para 2050 (Zaffar, 2020).

El pescado se considera un alimento seguro en general (Novoslavskij, y otros, 2016). Sin embargo, también puede ser un vehículo de varios representantes de enfermedades que afectan al ser humano una vez consumen este animal, especialmente el pescado que ha sido sujetado a prácticas de higiene deficientes a lo largo de su procesamiento y manipulación (Novoslavskij, y otros, 2016).

Edwardsiella tarda es un patógeno común de los peces que causa una de las enfermedades septicémicas más importantes, responsable de la mortalidad masiva en los peces de agua dulce

y, en consecuencia, de grandes pérdidas económicas en las granjas de peces en muchos países como América del Norte, Japón, Taiwán, Tailandia y África (Nagy, Fadel, Al-Moghny, & Ibrahim, 2018), resultando en un riesgo para la salud humana y animal (OMS, 2020).

Con el fin de evitar estas enfermedades, se ha hecho frecuente el uso de antibióticos, desinfectantes y pesticidas, los cuales son capaces de controlar la enfermedad, sin embargo, el uso de estos productos conlleva un grave riesgo tanto para el ecosistema acuático, como para la salud humana (García, 2018). Además, la presencia de genes de resistencia a los antibióticos (ARG) en estos microorganismos ha provocado preocupaciones sobre la propagación de la resistencia a los antibióticos (RAM) en el medio ambiente y entre los seres humanos (Brunton, y otros, 2019).

Es por todo lo mencionado que se plantea el uso de extractos naturales de plantas como una alternativa favorable para el tratamiento de las enfermedades bacterianas presentes en piscicultura. Específicamente, los extractos de las hojas senescentes de *Terminalia catappa*. Existen investigaciones que sugieren que las fracciones más polares obtenidas de las hojas de *Terminalia catappa* son efectivas contra bacterias (Busso, Munafo, Galie, & Bucciarelli, 2020) y hongos (Morales, y otros, 2019); estas investigaciones resultan del uso de las hojas como tratamiento natural en India y Tailandia para cicatrización de heridas y como promotor de cría de peces siameses (Chansue, 2008).

En la actualidad hay muy poca información acerca de la actividad antibacteriana y de la capacidad antioxidante de estos extractos obtenidos de las hojas de *Terminalia catappa*, particularmente no existe información relativa a la actividad biológica contra *Edwardsiella tarda*, por lo que es importante considerar el uso de este recurso natural como una alternativa a la utilización de antibióticos para el tratamiento de bacteriosis comunes en granjas de cultivo de peces. Considerando estas necesidades y sabiendo que el árbol de “almendro de la India”

(*Terminalia catappa*) crece comúnmente en las zonas tropicales ecuatorianas, se plantea la siguiente pregunta de investigación: ¿Los extractos de hojas senescentes de *Terminalia catappa* son capaces de inhibir el crecimiento *in vitro* de *Edwardsiella tarda*?

Para llevar a cabo la investigación, se colectaron hojas de la especie vegetal en Santa Rosa, provincia de El Oro, para posteriormente ser analizadas en la Universidad Politécnica Salesiana por medio de sus laboratorios de Ciencias de la Vida, en la sede de la ciudad de Quito.

Evaluar la actividad antioxidante y la actividad inhibitoria sobre *Edwardsiella tarda* de los extractos hidroetanólicos de hojas senescentes en fase terminal de *Terminalia catappa*, es el objetivo general que se plantea en esta investigación.

Dentro de los objetivos específicos se establece determinar la proporción de mezcla hidroetanólica que produzca la máxima extracción de fenoles, así como evaluar cualitativamente la composición química general de las hojas senescentes de *Terminalia catappa* por medio de tamizaje fitoquímico y valorar la actividad antioxidante de las fracciones polifenólicas de los extractos aislados, mediante los métodos DPPH y ABTS. Por último, se plantea determinar la actividad inhibitoria de las fracciones polifenólicas sobre *Edwardsiella tarda*. Complementariamente se plantea comparar los resultados de actividad antioxidante y antibacteriana entre extractos de hojas senescentes y una mezcla cosechada al azar de hojas verdes y senescentes con el propósito de corroborar la información descrita en la literatura etnobotánica que menciona que son las hojas senescentes las que presentan las características apropiadas para ser usadas en tratamientos de peces enfermos.

Por tanto, como hipótesis nula se plantea que no existe una diferencia significativa en entre los extractos evaluados (extracto de hojas mezcladas y extracto de hojas senescentes) en relación a su capacidad antioxidante y actividad biológica frente a *Edwardsiella tarda*.

2. Marco conceptual

2.1 Almendro de la India (*Terminalia catappa*)

Es un árbol de gran tamaño perteneciente a la familia Combretaceae, mayormente conocido como Almendro de la India, está distribuido ampliamente en áreas tropicales, subtropicales y principalmente zonas costeras (Hevira et al., 2021; Yakubu et al., 2020) Mediante análisis se ha demostrado que este árbol tiene una gran importancia medicinal ya que posee propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antimicrobianas, antidiabéticos, anticancerígenos, entre otras (Hevira et al., 2021), esto debido a su composición rica en fenoles, flavonoides, taninos, saponinas, entre otros (Yakubu et al., 2020), sobre todo presentes en sus hojas como por ejemplo la vitexina, isovitexina, rutina, ácido gálico, ácido elágico, punicalagina y punicalina, por nombras algunos (Delange et al., 2016).

Es un árbol de gran tamaño y poco ramificado que alcanza, aproximadamente, 25 metros de alto, su tronco puede alcanzar comúnmente el metro de diámetro, posee hojas aovadas que oscilan los 10 a 30 centímetros de largo, también se puede observar la presencia de flores con forma de espiga cuyo tamaño varía entre 5 a 15 centímetros y finalmente frutos elipsoidales (Guerra, Valdez, Orozco & Fuentes, 2016).

Tabla 1

Clasificación taxonómica de *Terminalia catappa* L.

Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Myrtales

Familia:	Combretaceae
Género:	Terminalia
Especie:	catappa L.

Fuente: (Buenaño & León, 2016).

Elaborado por: Las autoras 2021.

2.2 Metabolitos secundarios

Son moléculas orgánicas producidas por las plantas las cuales no participan en procesos metabólicos primarios indispensables para la sobrevivencia de las mismas, sin embargo son de gran importancia para un gran cantidad de funciones secundarias que se basan en la interacción de la planta con el ambiente (Sepúlveda-Vázquez et al., 2018). Estos metabolitos secundarios pueden ser encontrados en una mayor cantidad en hojas maduras a comparación de hojas verdes (Granados-Sánchez et al., 2008).

2.2.1 *Compuestos fenólicos*

Son metabolitos secundarios que se ha demostrado tienen actividad antimicrobiana y pueden encontrarse en extractos vegetales (Rodríguez-Maturino et al., 2015), esto debido a que pueden ser sintetizados por las plantas, en muchos casos estos les sirven como un mecanismo de defensa ante posibles enemigos, así como también pueden ser los responsables de una coloración específica a la planta, en cuanto a los beneficios para el ser humano, su consumo contribuye a una buena alimentación ya que son una fuente de antioxidantes y saborizantes que hacen aún

más beneficioso el consumo de ciertos alimentos, logrando de esta manera incluso la prevención de ciertas enfermedades.

2.2.1.1 Flavonoides

Los flavonoides son metabolitos secundarios producidos por las plantas vasculares, en algunos casos con el fin de brindarles una protección contra posibles depredadores, o una resistencia para evitar la fotooxidación producida por la luz ultravioleta, de la misma manera también pueden servir de aporte para atraer insectos polinizadores por medio de algún color u olor característico (Estrada-Reyes et al., 2012).

Los flavonoides son sustancia capaces de evitar ciertos tipos de enfermedades, como por ejemplo enfermedades neurodegenerativas o cardiovasculares (Duarte & Pérez-Vizcaíno, 2015), también se le atribuye propiedades antiinflamatorias, y como uno de sus principales intereses es que poseen importantes propiedades antioxidantes, razón por la cual tiene su gran potencial beneficioso a la salud, ya que tiene la capacidad de secuestrar radicales libres y evitar la generación de especies consecuentes reactivas de oxígeno (Chong, 2011).

2.2.1.2 Ácidos fenólicos

Son moléculas sencillas presentes en especies vegetales, que como su nombre indica contienen un anillo fenólico y una función orgánica de ácido carboxílico, los ácidos fenólicos están separados en dos grupos: los ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos y tienen una importante capacidad antioxidante (Peñarrieta et al., 2014).

2.3 Extractos vegetales

Son compuestos obtenidos de la aplicación de diversos métodos de extracción mediante el uso de un tejido vegetal y un solvente adecuado, con el fin de conseguir una diferente gama de principios activos presentes en una determinada planta (Santamaría et al., 2015).

2.3.1 *Métodos de obtención de extractos vegetales*

- **Extracción asistida por ultrasonido:** este método es presentado como amigable con el ambiente, ha sido una de las más utilizadas en investigaciones recientes ya que se han reportado altos rendimientos en la obtención de compuestos bioactivos con menor cantidad de disolvente y en tiempos cortos de extracción (Wong, Aguilar, Veana, & Muñiz, 2020).
- **Soxhlet:** es una técnica comúnmente utilizada para la separación sólido-líquido con el fin de extraer los compuestos que contiene una muestra sólida, con la ayuda de un disolvente el cual tiene un reflujo continuo a través del equipo, evitando así la disminución del volumen (Valencia, 2018).
- **Maceración:** Consiste en poner en contacto el material vegetal seco y pulverizado junto con un solvente adecuado el cual puede ser agua, un alcohol alifático o bien la mezcla de ambos, estos deben mantenerse en contacto por un periodo considerable de tiempo hasta conseguir la extracción deseada. La eficiencia de este método puede depender algunos factores controlables y no controlables (Duarte Trujillo et al., 2020).

2.4 *Edwardsiella tarda*

Edwardsiella, que pertenece a la familia Enterobacteriaceae, es un género que trata de bacilos Gram negativos móviles (Cortés et al., 2019), esta bacteria es la causante de la enfermedad

conocida como edwardsielosis, la cual puede afectar tanto a peces como a anfibios y mamíferos marinos, también existe evidencia de que es posible que el hombre también se vea afectado por esta bacteria, debido al consumo inadecuado o mal preparado de un animal infectado (Bujan et al., 2014).

2.4.1 Edwardsielosis

La edwardsielosis es una enfermedad causada por la bacteria del género *Edwardsiella*, la misma puede darse tanto en humanos como en peces, así como en otros géneros animales, y puede ser transmitida de un género o de una especie a otra. En todos los casos se presenta una sintomatología similar como son inflamaciones, abscesos y necrosis en diferentes órganos y tejidos, además la diseminación sistémica de la bacteria puede desencadenar septicemia (Verjan, Iregui & Hirono, 2012). A causa de esta enfermedad se ha evidenciado grandes pérdidas en producción tanto de peces de agua dulce como salada, ocasionando importantes daños en la industria piscícola (Choudhury et al., 2017).

3. Metodología

3.1 Preparación de muestras

Se recolectó 6 kg de hojas de *Terminalia catappa*, de los cuales 3 kg correspondieron únicamente a hojas senescentes y los 3 kg restantes correspondieron a una mezcla de hojas entre verdes y senescentes colectadas al azar, este procedimiento se llevó a cabo desde noviembre y finalizando en diciembre del año 2020, en el cantón Santa Rosa de la provincia de El Oro.

La recolección se llevó a cabo mediante el uso de un cuchillo, cortando las ramas pequeñas que contengan las hojas, para de esta manera evitar dañarlas, a continuación, cada hoja recolectada fue depositada en dos bolsas plásticas limpias, las cuales fueron previamente etiquetadas para diferenciar las hojas mezcladas de las hojas senescentes, para después ser trasladadas hasta el laboratorio de la Universidad Politécnica Salesiana (Ciencias de la Vida).

Cada hoja fue limpiada delicadamente con papel para retirar cualquier suciedad o residuo de polvo y también lograr deshacerse de otros insectos. Luego cada muestra fue cubierta con papel periódico y se colocaron en una prensa de madera para luego someterlas a un secado solar.

Ambos tipos de hojas fueron pulverizadas por separado, utilizando una licuadora industrial hasta obtener partículas de pequeño tamaño, las cuales posteriormente fueron pasadas a través de un tamiz N° 8, con el fin de unificar el tamaño.

3.2 Elaboración de extractos y cuantificación de fenoles totales por el método colorimétrico de Folin Ciocalteu.

a) Elaboración de extractos

Para la preparación de los extractos se analizaron tres métodos: extracción asistida por ultrasonido, soxhlet y maceración.

b) Cuantificación de fenoles totales por el método colorimétrico de Folin Ciocalteu

Este proceso de cuantificación de fenoles totales se llevó a cabo como se redacta en Noriega, Sola, Barukcic, García, & Osorio, (2015).

Preparación del reactivo de Folin Ciocalteu

Para la preparación del reactivo se siguió el procedimiento descrito en Cortez, Falcán, & Pirovani, (2018). Empezando con disolver 10 g de tungstato de sodio dihidratado con 0,200 g de ácido fosfomolibdico ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$) y 5 mL de ácido fosfórico (H_3PO_4) al 85 % en 75 mL de agua purificada. Se sometió a reflujo durante 120 minutos, posteriormente se llenó con 100 mL de agua purificada.

Obtención de la curva de calibración

La obtención de la curva de calibración estuvo basada en la preparación de ácido gálico en forma de soluciones, con pureza de 99,5 %. Con este objetivo, primero se deben elaborar 100, 250 y 500 ppm de ácido gálico: se pesan 1, 2 y 5 mg de ácido gálico respectivamente y se adicionan 10 mL de alcohol al 96 % a las tres soluciones.

Posteriormente, se prepararon tres nuevas soluciones tomando 0,05 mL de los 100, 250 y 500 ppm y, a cada una, se le añadieron 3,95 mL de agua destilada, 0,25 mL de reactivo Folin y 0,75 mL de carbonato de sodio al 20 %.

3.2.1 *Extracción asistida por ultrasonido y cuantificación de fenoles*

Se obtuvieron distintas muestras de extractos con diferentes proporciones etanol: agua, las cuales fueron sometidas al equipo de ultrasonido en 4 diferentes tiempos: 30, 45, 90 y 120 minutos. Consiguiente a esto se realizó la prueba de Folin Ciocalteu, cuyos resultados se explican en la sección 3, con el fin de evaluar la cantidad de fenoles en cada muestra. Cabe mencionar que, para cada tiempo, se hizo la lectura en el espectrofotómetro con tres repeticiones.

Obtención de extracto acuoso.

Para obtener la solución acuosa, se utilizó una sola concentración de agua destilada, (Tabla 2.) tanto para hojas mezcladas como para hojas senescentes se realizaron 3 repeticiones en tubos de ensayo que contenían 1,5 g muestra vegetal seca y 15 mL de agua destilada, que seguidamente se llevaron al ultrasonido por 30 minutos y pasado este tiempo se retiró del equipo. El mismo procedimiento descrito anteriormente se repitió para tiempos de 45, 90 y 120 minutos.

Obtención de extracto etanólico.

Para obtener los extractos etanólicos, se prepararon 6 diferentes concentraciones (70, 60, 50, 40, 30 y 4 %) de etanol y agua destilada (Tabla 2), con 3 repeticiones de cada concentración, por lo que se prepararon 18 tubos de ensayo tanto de hojas mezcladas como de hojas senescentes, con una proporción 1:10 agregando 1,5 g de la droga seca y 15 mL del solvente en cada tubo. Una vez preparadas las muestras se las llevó al ultrasonido por 30 minutos y pasado este tiempo se retiró del equipo. El mismo procedimiento descrito anteriormente se repitió para tiempos de 45, 90 y 120 minutos.

Tabla 2

Concentraciones para la sonicación en ultrasonido

Tipo de extracto	Código	Proporción	Etanol (mL)	Agua destilada (mL)
Acuoso	E1	0:100	0,0	15,0
Etanólico	E2	30:70	4,5	10,5
Etanólico	E3	40:60	6,0	9,0
Etanólico	E4	50:50	7,5	7,5
Etanólico	E5	60:40	9,0	6,0
Etanólico	E6	70:30	10,5	4,5
Etanólico	E7	96:04	14,4	0,6

Elaborado por: Las autoras, 2021

Los extractos acuosos y etanólicos, en las concentraciones etanol:agua correspondientes (tabla 2), tanto de la mezcla de hojas (senescentes y verdes) y hojas senescentes, fueron utilizados para disponer las soluciones que se detallan en la tabla 3:

Cuantificación de fenoles

Tabla 3

Preparación de soluciones para fenoles totales por extracción asistida de ultrasonido.

Extracto acuoso	Agua destilada	Reactivo de Folin	Carbonato de sodio al 20 %
------------------------	-----------------------	--------------------------	-----------------------------------

Blanco	0 mL	4 mL	0,25 mL	0,75 mL
E1	0,05 mL	3,95 mL	0,25 mL	0,75 mL
Extracto etanólico				
Blanco	0 mL	4 mL	0,25 mL	0,75 mL
E2	0,05 mL	3,95 mL	0,25 mL	0,75 mL
E3	0,05 mL	3,95 mL	0,25 mL	0,75 mL
E4	0,05 mL	3,95 mL	0,25 mL	0,75 mL
E5	0,05 mL	3,95 mL	0,25 mL	0,75 mL
E6	0,05 mL	3,95 mL	0,25 mL	0,75 mL
E7	0,05 mL	3,95 mL	0,25 mL	0,75 mL

Elaborado por: Las autoras, 2021

Para la mezcla de hojas, como para las hojas senescentes, cada ensayo de cada extracto se realizó por triplicado.

Análisis estadístico

Para determinar la existencia de diferencias en el contenido de fenoles totales en las hojas senescentes y en la mezcla de hojas de *Terminalia catappa* mediante el método Folin Ciocalteu para los extractos realizados por la técnica de ultrasonido, se aplicó una prueba de ANOVA de dos vías ($\alpha=0.05$), considerando el análisis previo de cumplimiento de normalidad y homocedasticidad usando las pruebas de Shapiro Wilks y de Levene respectivamente. Posteriormente, se aplicó una prueba post hoc de Tukey.

3.2.2 *Extracción mediante Soxhlet y cuantificación de fenoles*

Se utilizó 10 g de muestra seca, pulverizada y tamizada, y 300 mL de solvente (70 etanol:30 agua). La muestra seca se depositó en un cartucho filtrante de papel y se lo instaló en el tubo Soxhlet. El ensamble del equipo se realizó con tubos refrigerantes. Los 300 mL del solvente se colocaron en matraces de 500 mL.

El equipo fue colocado sobre planchas de calentamiento. Tanto para la mezcla de hojas como para las hojas senescentes, se procedió a retirar los extractos a la tercera, cuarta y quinta sifonada para luego ser concentrados en un rotavapor.

Cuantificación de fenoles

Posterior a la recolección de los extractos resultantes de la tercera, cuarta y quinta sifonada, y de su concentración en un rotavapor, se procedió a la preparación de las siguientes soluciones:

Tabla 4

Preparación de soluciones para fenoles totales de la extracción por Soxhlet.

Extracto etanólico		Agua destilada	Reactivo de Folin	Carbonato de sodio al 20 %
Blanco	0 mL	4 mL	0,25 mL	0,75 mL

3ra	0,05 mL	3,95 mL	0,25 mL	0,75 mL
sifonada				
4ta	0,05 mL	3,95 mL	0,25 mL	0,75 mL
sifonada				
5ta	0,05 mL	3,95 mL	0,25 mL	0,75 mL
sifonada				

Elaborado por: Las autoras, 2021

Para la mezcla de hojas, como para las hojas senescentes, cada ensayo correspondiente a cada sifonada se realizó por triplicado.

Análisis estadístico

Para determinar la cantidad de fenoles totales presentes en las hojas senescentes y en la mezcla de hojas de *Terminalia catappa* mediante el método Folin Ciocalteu para los extractos obtenidos mediante Soxhlet, se procedió de manera semejante a la presentada para la técnica de ultrasonido, tomando como factores las concentraciones de disolventes y el número de sifonadas.

3.2.3 Extracción mediante Maceración y cuantificación de fenoles

Se realizó la maceración de hojas mezcladas y de hojas senescentes de *Terminalia catappa*, para lo cual se utilizó dos frascos ámbar donde se preparó 400 mL de cada extracto, en ambos casos se utilizó una proporción de 1:10 de muestra seca y mezcla hidroetanólica respectivamente. La proporción del disolvente etanol: agua varió en ambos casos, tomando en cuenta los mejores resultados de concentración que se obtuvo en la extracción asistida por

ultrasonido se preparó el extracto de hojas mezcladas en una proporción 50:50 y para la extracción de hojas senescentes se utilizó una proporción de 70:30 de etanol y agua. Los extractos se dejaron reposar durante 2 días, y pasado este tiempo se filtró y se sometió a ambos tipos de extractos al rotavapor, con el fin de evaporar el etanol contenido en cada uno de ellos. Después, como se explica detalladamente a continuación, se tomó cada día una muestra con el fin de medir la concentración de fenoles.

Cuantificación de fenoles

Al poner a macerar tanto las hojas mezcladas como senescentes se realizó la toma de una muestra cada día durante 2 días para cuantificar la cantidad de fenoles mediante el método de Folin ciocalteu con las siguientes soluciones:

Tabla 5

Preparación de soluciones para fenoles totales de la extracción por maceración

Extracto etanólico		Agua destilada	Reactivo de Folin	Carbonato de sodio al 20 %
Blanco	0,00 mL	4,00 mL	0,25 mL	0,75 mL
Hojas mezcladas	0,05 mL	3,95 mL	0,25 mL	0,75 mL
Hojas senescentes	0,05 mL	3,95 mL	0,25 mL	0,75 mL

Elaborado por: Las autoras, 2021

Tanto para la mezcla de hojas, como para las hojas senescentes, cada ensayo se realizó por triplicado.

Lectura de resultados

Una vez adicionado el reactivo Folin y el carbonato de sodio, las muestras reposaron en ausencia de luz durante 2 horas. Posteriormente, se mensuraron las absorbancias en el espectrofotómetro marca UV-VIS, modelo Jasco V-730 a 765 nm. Para las lecturas de cada ensayo se realizaron dos repeticiones. Etanol al 96 % fue utilizado como blanco.

Con el fin de determinar la cantidad de fenoles totales en cada día de la maceración, se utilizó una curva de calibración con ácido gálico como estándar referencial, tal y como se muestra en la figura 1.

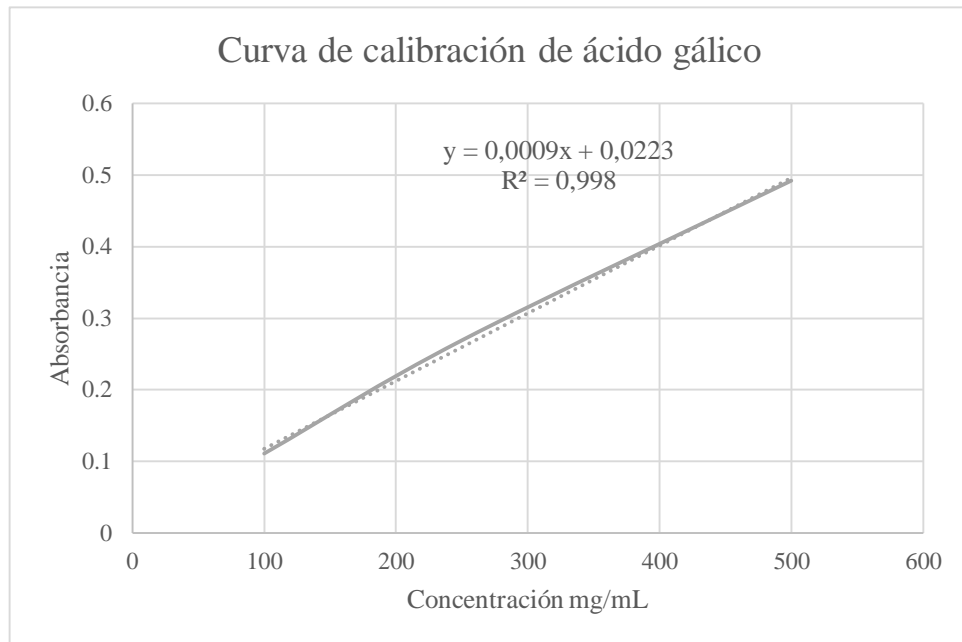


Figura 1. Curva de calibración con ácido gálico.

Elaborado por: Las autoras, 2021

Donde se puede observar que la concentración es directamente proporcional a la absorbancia, obteniendo un R^2 de 99,8 % lo que demuestra una buena linealidad, también se puede observar que da como resultado la ecuación de la recta $y = 0,0009 x + 0,0223$, que nos permitió generar los resultados de concentración mediante la ecuación 2.

Ecuación 2.

Concentración en función de la curva de calibración.

$$x = \frac{y - 0,0223}{0,0009}$$

Dónde:

y = Absorbancia promedio

Análisis estadístico

Se aplicó tanto la prueba de Shapiro-Wilks y de Levene con el fin de comprobar que los datos poseen tanto normalidad como homogeneidad, con lo cual fue posible interpretar que los datos son paramétricos, en este caso la mejor opción fue aplicar una prueba t ($\alpha=0,05$) para muestras independientes y de esta manera obtener el valor del p para el contraste de hipótesis.

3.3 Tamizaje Fitoquímico

Para los ensayos cualitativos se trabajó con los extractos de la maceración de la mezcla de hojas en alcohol y agua (70 % y 30 %) y la maceración en alcohol y agua (50 % y 50 %) de hojas senescentes. Se trabajó con la maceración de estas concentraciones por ser las que mostraron mejores resultados en la cuantificación de fenoles.

3.3.1 *Ensayo de Dragendorff*

Para verificar la existencia de alcaloides libres, el reactivo Dragendorff fue preparado como se especifica en Ballesteros, (2018): se mezcló 21,3 mL de ácido nítrico para posteriormente agregar una cantidad adecuada de agua destilada hasta alcanzar los 62 mL. En 20 mL de la solución obtenida se diluyeron 5 g de subnitrato de bismuto. En una composición aparte, se diluyeron 31,2 g de yoduro de potasio en 69 mL de agua. Por último, se mezcló las dos soluciones.

Para continuar con el ensayo, como se menciona en Ballesteros, (2018), se incluyó 2 mL del extracto etanólico de la mezcla de hojas y de las hojas senescentes en un tubo de ensayo y se sometió a baño María hasta evaporar. El remanente se diluyó nuevamente en 1 mL de ácido clorhídrico al 1 % en agua. Finalmente, se añadieron 3 gotas del reactivo de Dragendorff. Dicho procedimiento fue aplicado por triplicado en ambos extractos.

3.3.2 *Ensayo Cloruro Férrico*

Para verificar la existencia de taninos y fenoles, se colocaron 2 mL de extracto etanólico de la mezcla de hojas y 2 mL de extracto etanólico de las hojas senescentes en un tubo de ensayo y se adicionaron 3 gotas de tricloruro férrico al 5 %.

3.3.3 *Ensayo Shinoda*

Con el objetivo de verificar la presencia de flavonoides, se agregaron 2 mL de extracto etanólico de la mezcla de hojas y 2 mL de extracto etanólico de las hojas senescentes en un tubo de ensayo, se añadió 1 mL de ácido clorhídrico de grado puro y un fragmento de cinta de magnesio metálico.

Dada la reacción, se aguardó 5 minutos y se incorporó 1 mL de alcohol amílico. Después de mezclar y dejar reposar, se observó si las fases se separaron.

El proceso se realiza por triplicado para los dos extractos.

3.4 Cuantificación de flavonoides totales por el método de cloruro de aluminio

Para la cuantificación de flavonoides totales se tomó en consideración el método presentado por Souza, Fonseca, Silva, Silva, & Martins, (2018).

La cuantificación de flavonoides totales se realizó tanto en la mezcla de hojas como en las hojas senescentes, escogiendo los extractos producto de la maceración a concentraciones de 70 % en etanol y 30 % en agua para la mezcla de hojas, y la maceración de 50 % en etanol y 50 % en agua para las hojas senescentes.

Preparación de la curva de calibración

A partir de Quercetina de pureza del 95 %, se realizó una solución madre de 1000 ppm colocando 10 mg en un balón volumétrico y aforando a 10 mL con etanol al 96 %.

A partir de la solución madre se realizaron otras cuatro soluciones de Quercetina: 100, 200, 500 y 700 ppm. Considerando las nuevas soluciones, se preparó la curva de calibración como lo especifica la siguiente tabla:

Tabla 6

Curva de calibración para flavonoides totales.

Concentración de Quercetina	Quercetina	Agua destilada	Etanol al 96 %	Acetato de Potasio 1M	Cloruro de Aluminio 1 %
0 ppm	0 mL	2,800 mL	2 mL	0,100 mL	0,100 mL
100 ppm	0,500 mL	2,800 mL	1,500 mL	0,100 mL	0,100 mL
200 ppm	0,500 mL	2,800 mL	1,500 mL	0,100 mL	0,100 mL
500 ppm	0,500 mL	2,800 mL	1,500 mL	0,100 mL	0,100 mL
700 ppm	0,500 mL	2,800 mL	1,500 mL	0,100 mL	0,100 mL

Elaborado por: Las autoras, 2021

Preparación de soluciones de extractos

Se procedió a utilizar los extractos de la mezcla de hojas y de las hojas senescentes como lo especifica la siguiente tabla:

Tabla 7

Preparación de los extractos para flavonoides totales.

Extracto	Agua destilada	Etanol al 96 %	Acetato de Potasio 1M	Cloruro de Aluminio 1 %
-----------------	---------------------------	---------------------------	----------------------------------	--

Blanco	0 mL	2,800 mL	2 mL	0,100 mL	0,100 mL
Mezcla de hojas/senescentes	0,500 mL	2,800 mL	1,500 mL	0,100 mL	0,100 mL

Elaborado por: Las autoras, 2021

Cada ensayo, tanto de la mezcla de hojas como de las hojas senescentes, se hizo por triplicado.

3.5 Determinación de la actividad antioxidante

Con el propósito de evaluar la actividad antioxidante se utilizó el extracto etanólico de la maceración (70 % en etanol y 30 % en agua) de la mezcla de hojas y el extracto etanólico de la maceración (50 % en etanol y 50 % en agua) de las hojas senescentes.

3.5.1 Método DPPH

Para preparar una solución 0,5 mM se necesitó pesar 49 mg de DPPH y aforar a 250 mL con etanol al 96 % y colocarlo en un frasco ámbar. Es importante tomar en cuenta el hecho de poner a refrigerar esta solución, para utilizarlo posteriormente.

Se tomó 1 mL del extracto de la mezcla de hojas y 1 mL del extracto de las hojas senescentes y se afora cada uno a 10 mL con etanol al 96 %. Consecuentemente, se preparó una solución de ácido ascórbico de 1000 ppm.

Se utilizó el ácido ascórbico (vitamina C) como estándar ya que es conocido por su potencial para atrapar diferentes formas de oxígeno, disminuir radicales antioxidantes primarios comportándose de manera sinérgica con los mismos. (FAO, 1993).

Las muestras de vitamina C, así como las de los extractos de la mezcla de hojas y de las hojas senescentes se prepararon en tubos de ensayo envueltos en papel aluminio como lo indica la siguiente tabla:

Tabla 8

Preparación de soluciones para la cuantificación de actividad antioxidante por DPPH.

Tubo de ensayo	Muestra	Reactivo DPPH	Etanol al 96 %
Blanco	0	2,9 mL	100 uL
1	10 uL	2,9 mL	90 uL
2	20 uL	2,9 mL	80 uL
3	50 uL	2,9 mL	50 uL
4	80 uL	2,9 mL	20 uL
5	100 uL	2,9 mL	0 uL

Elaborado por: Las autoras, 2021

Se agitaron los tubos de ensayo durante 30 minutos.

Se programó el espectrofotómetro a la longitud de onda de 517 nm y se procedió a encerrar el equipo usando etanol al 96 %. Se midieron las absorbancias de las muestras (comenzando por el blanco) y después la muestras en forma ascendente.

Para el cálculo del porcentaje de inhibición del radical DPPH se utiliza la siguiente ecuación:

Ecuación 1: Porcentaje de inhibición del radical DPPH

$$\% \text{ Inhibición} = 1 - \frac{AbsA}{AbsB} * 100$$

AbsA: absorbancia de las soluciones de los dos tipos de extractos y las soluciones de ácido ascórbico

AbsB: absorbancia del DPPH sin extracto

De acuerdo a Bravo, (1998), el producto de la técnica de DPPH, se puede representar como coeficiente de inhibición (IC_{50}), % de captación y mg/Equivalente de Trolox o vitamina C.

3.5.2 *Método ABTS*

Para la preparación del reactivo ABTS, se pesaron 3,84 mg/mL del reactivo en una balanza analítica y se llevó a aforo a 100 mL con agua ultra pura (esto corresponde a la solución A).

Para la preparación de la solución B (persulfato de potasio), se pesaron 37,84 mg/mL en una balanza analítica y se aforó también a 100 mL con agua ultra pura.

Para la preparación de $K_2S_2O_8$, se disolvieron 188,2 mg de $K_2S_2O_8$ en 10 mL de agua destilada para obtener una solución 70 mM de $K_2S_2O_8$.

Posteriormente, para preparar el reactivo radicalizado ABTS, se añadieron 17,6 μ L de la solución B por cada mililitro de la solución A. Esta mezcla fue almacenada en un frasco ámbar por 16 horas a temperatura ambiente.

Para alcanzar una absorbancia entre 0,8 – 1,0 a 734 nm en el espectrofotómetro, se realizaron diluciones con metanol.

Las soluciones del extracto de la mezcla de hojas como de las hojas senescentes se prepararon de acuerdo a la tabla siguiente:

Tabla 9

Preparación de soluciones para la cuantificación de actividad antioxidante por ABTS.

Tubos de ensayo	Extracto	ABTS	Etanol al 96 %
Blanco	0	2,9 mL	100 µL
1	3 µL	2,9 mL	
2	5 µL	2,9 mL	
3	10 µL	2,9 mL	Completar a 3 mL
4	20 µL	2,9 mL	
5	50 µL	2,9 mL	
6	100 µL	2,9 mL	

Elaborado por: Las autoras, 2021

Se tomaron 2 mL de ABTS radicalizado y se realizaron diluciones con etanol hasta alcanzar una absorbancia de 0,70 +/- 0,02 a 734 nm en el espectrofotómetro.

Por último, se calculó el porcentaje de la capacidad antioxidante (ecuación 1).

3.6 Identificación de flavonoides por Cromatografía de capa fina (TLC)

Se filtraron los extractos de hojas verdes y senescentes de *Terminalia catappa* preparados mediante maceración como se explica en el literal 2.1.3, utilizando filtros de jeringa PVDF de 0,45 µm y se los depositó en viales de 2 mL, para posteriormente llevarlos al equipo aplicador de muestra de inyección automática marca CAMAG modelo LINOMAT 5, el cual fue previamente configurado para inyectar 30 µL de los extractos con 3 repeticiones de cada uno y se repitió el mismo procedimiento para obtener 2 placas de silicagel.

A fin de realizar la fase móvil se siguió el procedimiento descrito por Hildebert et al., (2011) realizando una solución de 50 mL de cloroformo, acetato de etilo, metanol y ácido fórmico en proporciones 40:5:15:0.2. A continuación se colocó la fase móvil en la cámara para cromatografía y se dejó reposar por 15 minutos, una vez realizado esto se incorporó la placa

dentro de la cámara y se esperó hasta que el solvente alcanzó un 1 cm antes de llegar al final de la placa, se extrajo la placa y secó. El mismo procedimiento se repitió con la segunda placa.

En la primera placa se roció una solución de vainillina etanólica al 1 % e inmediatamente después se roció ácido sulfúrico etanólico al 10 %, tal y como lo dice el procedimiento para obtener un revelador realizado por Hildebert et al., (2011). En la segunda placa se roció la solución de DPPH preparada anteriormente con el fin de aseverar la actividad antioxidante de los extractos. Ambas placas se dejaron secar y se llevaron al equipo de lámpara UV para poder observar la separación de los componentes y la identificación de los mismos por medio de los Rfs (diferencia entre la distancia recorrida por el soluto y el solvente en la placa cromatográfica).

3.7 Actividad inhibitoria por medio de la técnica de microdilución en caldo.

Para la realización de la prueba se utilizó una única cepa liofilizada correspondiente a *Edwardsiella tarda* ATCC® 15947 en forma de KWIK-STIK, la cual fue sembrada en cajas Petri con agar tripticasa soya (TSA) e incubadas a 37 °C por 48 horas. Pasado este tiempo se inoculó la cepa en dos tubos con caldo tripticasa soya (TSB), y nuevamente fueron incubados a 37 °C por 24 horas. Posteriormente se realizó un estándar de McFarland en la escala de 0,5 equivalente a 10^8 UFC, utilizando la metodología propuesta por CDC; OMS, (2009), se preparó 10 mL de estándar añadiendo 0,05 mL de cloruro de bario ($BaCl_2$) al 1,175 % a 9,95 mL de una solución acuosa de ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 1 % y se compararon ambos tubos, donde uno de ellos presentó una turbidez muy similar al estándar (Anexo 5), por lo tanto este se utilizó como inóculo de la bacteria en los pocillos, el cual era equivalente a 1×10^8 UFC/mL.

Para el ensayo de microdilución usamos una metodología propia, creada según las necesidades que se fueron presentando a lo largo del desarrollo de la investigación, para lo cual se realizaron

3 repeticiones por lo que se usaron 3 microplacas de 96 pocillos, en cada una de los pocillos se asignaron muestras diferentes como se explica a continuación. En todos los pocillos se colocó 100 μ L de caldo Mueller Hinton, seguidamente en los primeros dos pocillos de la primera columna (A1 y B1) se agregó 100 μ L más de los dos controles positivos (ampicilina y terpineol), preparados con 41,05 mg de droga en 1 mL de suero fisiológico estéril, en los siguientes pocillos (C1 y D1) se agregó 100 μ L del extracto de hojas mezcladas y del extracto de hojas senescentes de *Terminalia catappa*.

Consecutivamente en todas las placas se utilizó una micropipeta multicanal para tomar 100 μ L de la primera columna y llevar el volumen a los pocillos siguientes, donde se obtuvieron 11 diferentes diluciones seriadas en cada placa. A continuación, se inocularon todos los pocillos de las tres placas con 15 μ L de inóculo bacteriano de *E. tarda*. Las placas fueron selladas con parafilm, envueltas en papel aluminio para protegerlas de la luz y llevadas a incubación en una incubadora con agitación orbital TE-420-TECNICAL a 37° C por 24 horas. Pasado este tiempo se agregó a cada pocillo 20 μ L de solución de TCC esterilizada y preparada el mismo día según la metodología descrita por De la Cruz & Ulloa, (2020), con una concentración al 1 % mediante la adición de 100 mg de colorante en 10 mL de agua destilada, una vez agregado esto se incubó nuevamente por 30 minutos a 37 °C. Una vez listas las placas se midió el crecimiento bacteriano en cada una de ellas, mediante un lector de micro placas a 630 nm.

Distribución de la microplaca

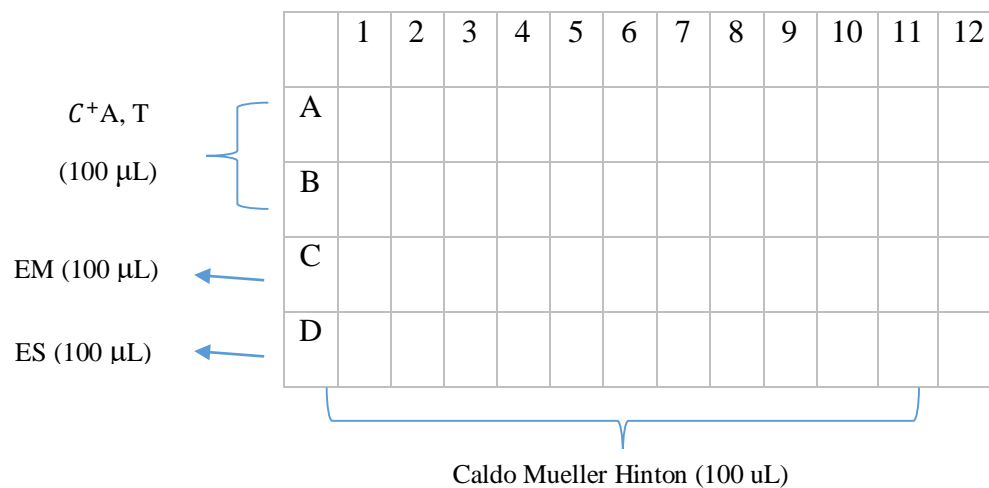


Figura 2. Distribución de la microplaca para evaluar la actividad inhibitoria de los extractos de hojas mezcladas y hojas senescentes de *Terminalia catappa*.

Nota: C^+A (Control positivo con ampicilina), C^+T (Control positivo con terpineol), EM (Extracto de hojas mezcladas), ES (Extracto de hojas senescentes).

Elaborado por: Las autoras, 2021.

4. Resultados y discusión

4.1 Elaboración de extractos y cuantificación de fenoles totales por el método colorimétrico de Folin Ciocalteu.

Elaboración de extractos

Para cada técnica ocupada se obtuvieron dos tipos de extractos, uno de ellos corresponde al extracto de hojas mezcladas y el otro al extracto de hojas senescentes. Con respecto a la extracción asistida por ultrasonido se obtuvieron 7 muestras para cada tipo de extracto, con diferentes proporciones de disolvente y sometidas a diferentes tiempos de exposición al ultrasonido. Mediante el método de maceración se obtuvo una muestra para cada tipo de extracto, usando una proporción de disolvente de 50:50 etanol:agua para el extracto de hojas mezcladas, y 70:30 para el extracto de hojas senescentes. Y finalmente, usando la extracción con el equipo soxhlet, se obtuvieron 3 muestras para cada tipo de extracto, las cuales se diferenciaban por el número de sifonadas realizadas (3, 4 y 5).

4.1.1 *Extracción asistida por ultrasonido y cuantificación de fenoles*

Mediante la técnica de extracción asistida por ultrasonido se obtuvo dos tipos de extractos con 7 diferentes proporciones del disolvente. A pesar de ser varias muestras, todas fueron procesadas con rapidez ya que el equipo solo requiere de minutos para obtener resultados, además de esto los materiales se optimizaron ya que no se requirió de grandes cantidades de muestra vegetal, así como tampoco de disolventes, lo mencionado lo corrobora Medina-Torres, (2017) quien asegura que una de las ventajas de esta técnica es su rapidez, ya que se necesita un promedio de 10 a 60 minutos para tener las muestras listas y además de esto solo exige un

uso moderado de materiales y disolventes, sin embargo una de las desventajas que menciona el autor es que podría ocurrir una degradación de los analitos debido a frecuencias altas.

Subsiguientemente, se muestran los resultados conseguidos en cuanto a la cuantificación de fenoles por el método de Folin Ciocalteu.

Hojas senescentes

El test estadístico denota un p-valor menor a 0.05, por ende, se considera suficiente evidencia para rechazar la hipótesis nula, es decir que hay diferencias significativas entre tratamientos para los dos factores analizados. Así mismo, existe interacción entre tiempo y tratamientos (anexo 2), es decir, existe una relación de dependencia entre el tiempo en que se expuso los extractos al ultrasonido y los tratamientos (diferentes concentraciones de etanol:agua). Se aplicó la prueba Tukey al 95 %, diferenciándose categorías como se presentan en las tablas 10 y 11:

Tabla 10

Concentración de fenoles expresada en mg/100 g, en función del tiempo de extracción asistida por ultrasonido y de hojas senescentes.

Tiempo	
120	$1,34^a \pm 0,05$
90	$0,90^b \pm 0,05$
45	$0,66^c \pm 0,05$
30	$0,41^d \pm 0,05$

Nota: Las letras minúsculas (a y b) denotan la comparación de diferentes grupos estadísticos.

Elaborado por: Las autoras, 2021.

En la tabla 10 se aprecia que el tiempo de 120 minutos de exposición del extracto a ultrasonido produce la mayor eficacia para la extracción. Estos resultados concuerdan con los presentados en Marrero & Morales, (2016) donde los resultados fueron mejores mientras mayor tiempo de exposición al ultrasonido se mantenía en estos extractos. Annegowda, Ween, Mordi, Ramanathan, & Mansor, (2012) también coincidieron con los resultados obtenidos en el empleo del ultrasonido para realizar extracción de fenoles en esta planta, donde rectifican la importancia de mayores tiempos de exposición al ultrasonido.

Tabla 11

Concentración de fenoles expresada en mg/100 g en función de la composición del disolvente en la extracción asistida por ultrasonido de hojas senescentes.

Tratamientos	
E6	$1,04^a \pm 0,07$
E1	$0,94^{ab} \pm 0,07$
E5	$0,87^{ab} \pm 0,07$
E3	$0,86^{ab} \pm 0,07$
E2	$0,81^{ab} \pm 0,07$
E4	$0,64^b \pm 0,07$
E7	$0,64^b \pm 0,07$

Nota: Las letras minúsculas (a y b) denotan la comparación de diferentes grupos estadísticos.

Elaborado por: Las autoras, 2021

En la tabla 11 se evidencia que el tratamiento 6, que corresponde a la mezcla 70:30 etanol/agua es estadísticamente diferente y produce la mayor extracción de fenoles (mg/g) comparado con los otros tratamientos.

Los resultados de la presente investigación concuerdan con los expuestos en Zhang, y otros, (2007) donde informan que el rendimiento de extracción más alto lo lograron con una concentración de etanol en el rango de 56 a 83 %, pero el rendimiento de extracción disminuyó con un contenido de etanol más bajo en el solvente de extracción.

Sin embargo, hay valores que difieren en cuanto a la concentración de etanol que presentan los tratamientos: no existe una secuencia clara de aumento o disminución de los valores de fenoles. Azis, Febrizky, & Aris, (2014) mencionan que los compuestos fenólicos generalmente son polares y se disuelven bien en disolventes también polares como son el agua y etanol (polar y menos polar respectivamente); debido a la presencia del grupo hidroxilo (-OH) altamente polar y al grupo no polar etilo del alcohol (C₂H₅-) por lo que puede disolver compuestos de polaridad menor. Es relevante mencionar que los resultados de Waszkowiak & Gliszczynska, (2016) indicaron relaciones entre la concentración de etanol en el solvente de extracción binario, el perfil de los compuestos fenólicos extraídos y la capacidad antioxidante de los extractos de linaza; entonces, se podría sugerir que la capacidad antioxidante de las hojas de *Terminalia catappa* podría afectar su propia cantidad de fenoles.

En las tablas 10 y 11 se presentan las medias aritméticas de la concentración y las categorías de los diferentes tiempos y tratamientos que se analizaron en la extracción asistida por ultrasonido y la posterior cuantificación de fenoles, expresados en mg/g, resultando como mejor tratamiento a la categoría A correspondiente al tiempo de 120 minutos y al tratamiento 6.

Con los resultados obtenidos de la extracción asistida por ultrasonido, se pudo determinar la concentración a usar posteriormente para continuar con la investigación, y así asegurar la mayor presencia de fenoles.

Mezcla de hojas

Los resultados conseguidos mediante la prueba de Anova muestran que existe diferencia significativa entre los diferentes tiempos de sonicación, así como entre tratamientos de diferente composición etanol/agua ($p < 0,05$), sin embargo, no existe relación entre los factores, lo que, de manera indirecta puede mostrar una diferente composición, comparando el extracto mixto con el extracto de hojas senescentes. La prueba de Tukey permite evidenciar las diferencias entre todos los tratamientos. categorías como se presentan en las tablas 12 y 13:

Tabla 12

Concentración de fenoles expresada en mg/100 g, en función del tiempo de extracción asistida por ultrasonido y de hojas mezcladas.

Tiempo	
120	$0,68^a \pm 0,02$
90	$0,59^b \pm 0,02$
45	$0,24^c \pm 0,02$
30	$0,24^d \pm 0,02$

Nota: Las letras minúsculas (a y b) denotan la comparación de diferentes grupos estadísticos.

Elaborado por: Las autoras, 2021

En la tabla 12, en comparación con la tabla 10, se puede observar resultados similares. Se reitera, entonces, como se menciona en la página 32: los resultados fueron mejores mientras mayor tiempo de exposición al ultrasonido se mantenía a los extractos. Sin embargo, se observa que los resultados no son tan altos como en las hojas senescentes; esto se puede deber a que la mayor cantidad de fenoles en las hojas de *Terminalia catappa* es cuando estas se encuentran en mayor estado de maduras (senescencia). Estos resultados coinciden con los expuestos en Seema, Meeta, Meenakshi, & Manjushree, (2015), donde confirman que las hojas de *Terminalia catappa*, mientras más maduras, mayor será su contenido fenólico.

Tabla 13

Concentración de fenoles expresada en mg/100 g en función de la composición del disolvente en la extracción asistida por ultrasonido de hojas mezcladas.

Tratamientos	
E2	0,57 ^a ± 0,03
E4	0,56 ^a ± 0,03
E3	0,55 ^a ± 0,03
E5	0,54 ^a ± 0,03
E6	0,51 ^a ± 0,03
E7	0,34 ^b ± 0,03
E1	0,31 ^b ± 0,03

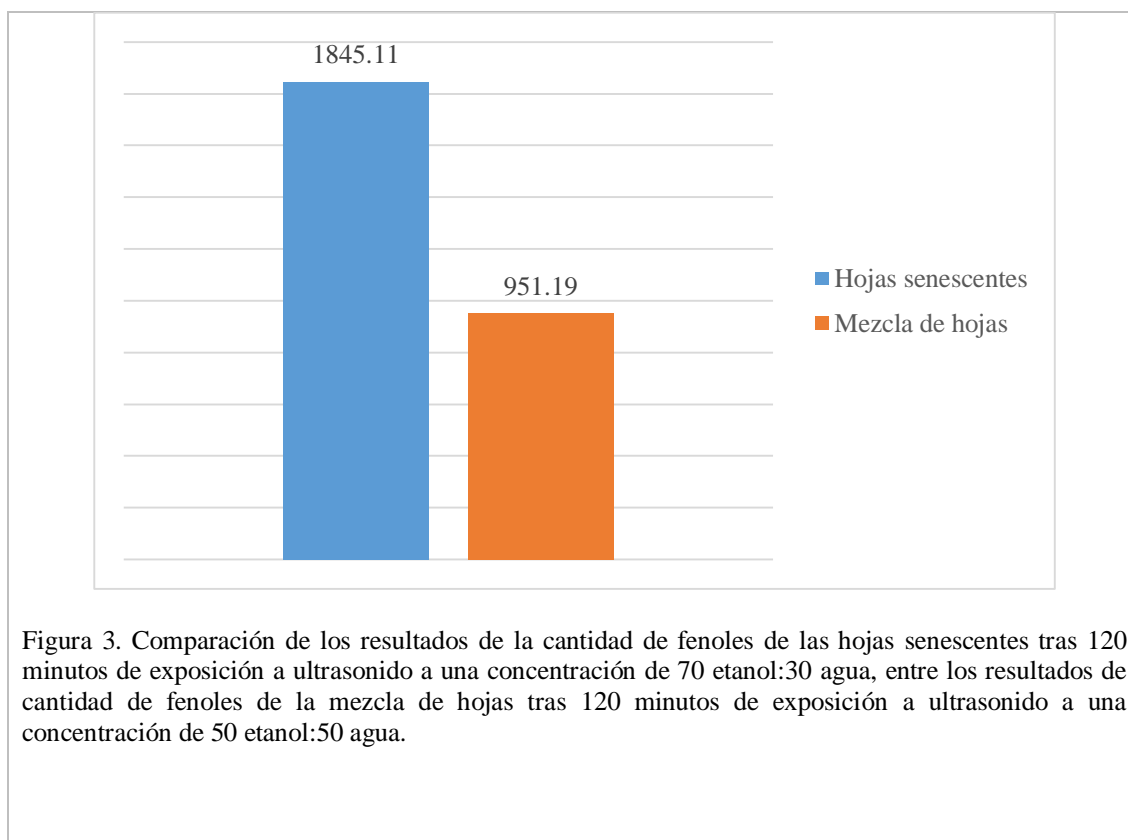
Nota: Las letras minúsculas (a y b) denotan la comparación de diferentes grupos estadísticos.

Elaborado por: Autoras, 2021.

En la tabla 13 se puede observar que los tratamientos E7 y E1 presentan concentraciones de fenoles equivalentes entre sí, pero significativamente diferentes a los otros tratamientos de

polaridades intermedias. Si bien en Naczk & Shahidi, (2006) se vuelve a mencionar que la recuperación de polifenoles de materiales vegetales está influenciada por la solubilidad de los compuestos en un solvente particular usado para el proceso de extracción (y depende de la polaridad del solvente), la diferencia de resultados podría atribuirse al menor gradiente de concentración del solvente, al prolongado intervalo de sonicación (exposición al ultrasonido) así como a la probable degradación que pudo haber ocurrido debido a la generación de radicales libres (Annegowda, Bhat, Min-Tze, Karim, & Mansor, 2012), y también a la capacidad antioxidante de los extractos, como se explicó en la página 32.

Se decidió trabajar con el ensayo 4 por tratarse de una proporción de 50 % en etanol y 50 % en agua, y así poder ahorrar los materiales lo mayor posible. Se concluyó así que esta sería la proporción utilizada para la maceración de la muestra vegetal de la mezcla de hojas, es decir, el futuro extracto de las hojas senescentes y verdes.



En la figura 3 se observa las concentraciones y tiempos de exposición a ultrasonido que fueron seleccionados por ser los que arrojaron mejores resultados de la cantidad de fenoles para cada tipo de extracto, concluyendo que las hojas senescentes representan al extracto con mayor contenido en este ensayo.

4.1.2 *Extracción mediante Soxhlet y cuantificación de fenoles*

Mediante la extracción soxhlet se obtuvo extractos sometidos a varias sifonadas, para llegar a la quinta sifonada se necesitó de aproximadamente 4 a 5 horas y en este caso fue necesario el uso de cantidades más grandes tanto de material vegetal como de disolventes, uno de los principales riesgos según menciona Medina-Torres, (2017), es que dependiendo del uso que se le dé, es posible que ocurra una exposición perjudicial a vapores orgánicos y también podría ocurrir una degradación en caso de existir analitos termolábiles.

Hojas senescentes

La prueba de Anova arrojó un p-valor menor a 0.05 (anexo 2), expresando que son valores significativamente diferentes. Se aplicó la prueba Tukey al 95 %

Tabla 14

Categorización de tratamientos de extracción mediante Soxhlet y cuantificación de la concentración de fenoles expresados en mg/100 g en hojas senescentes.

Sifonadas	
5	1,24 ^a ± 0,08
4	0,93 ^{ab} ± 0,08
3	0,87 ^b ± 0,08

Nota: Las letras minúsculas (a y b) denotan la comparación de diferentes grupos estadísticos.

Elaborado por: Las autoras, 2021

En la tabla 14 se observa que la quinta sifonada produce los mayores contenidos de fenoles, significativamente diferentes al ensayo con tres sifonadas. Considerando los resultados de la extracción asistida por ultrasonido, donde el mejor tiempo fue el de 120 minutos, es razonable suponer que los resultados de la extracción mediante Soxhlet y la cuantificación de fenoles sea parecida entre estos dos métodos de extracción. Estos resultados, y esta deducción, es sustentada por Neelavathi, Venkatalakshmi, & Brindha, (2013) donde sus resultados fueron mejores con el mayor número de sifonadas.

Es así, que con la comparación Tukey, se determinó que el mejor momento para la toma de muestras (y obtener la mayor cantidad de fenoles) es cuando sucede la quinta sifonada.

Mezcla de hojas

La prueba de Anova arrojó un p-valor menor a 0.05 (anexo 2), expresando que son valores significativamente diferentes. Se aplicó la prueba Tukey al 95 %

Tabla 15

Categorización de tratamientos de extracción mediante Soxhlet y cuantificación de la concentración de fenoles expresada en mg/100 g en la mezcla de hojas.

Sifonadas	
3	$0,45^a \pm 0,02$
5	$0,45^a \pm 0,02$
4	$0,26^b \pm 0,02$

Nota: Las letras minúsculas (a y b) denotan la comparación de diferentes grupos estadísticos.

Elaborado por: Las autoras, 2021

En la tabla 15 se puede observar que tanto el tratamiento 3 como el 5, que corresponden a la tercer y quinta sifonada, poseen una cantidad igual de fenoles. Estos resultados son peculiares ya que no siguen un orden obvio: la cuarta sifonada posee menor media que la tercera y que la quinta. En el estudio de Waszkowiak & Gliszczynska, (2016) se mostró que la relación etanol/agua del solvente de extracción es un factor importante que afecta la eficiencia de la extracción de compuestos fenólicos; un aumento en el volumen de etanol en los disolventes que probaron afectó negativamente la extracción de la mayoría de los compuestos fenólicos de su planta. Es decir, con más sifonadas, deberían existir mejores resultados, hecho que se puede aplicar con los resultados de la quinta sifonada. Pero, también se debe tener en cuenta que la muestra analizada en este apartado es una mezcla de hojas verdes y senescentes. Folin Ciocalteu se basa en la reacción rojo-ox (Prior, Xianl, & Schaich, 2005) y los resultados pueden ser afectados por diversas sustancias interferentes presentes en los extractos vegetales crudos (por ejemplo: azúcares, proteínas y otros compuestos no fenólicos). Si bien los resultados presentados en la tabla 21 son confusos, hay una gran variedad de probabilidades para explicarlos: desde sustancias interferentes de los extractos, hasta la naturaleza del reactivo utilizado para la cuantificación de fenoles.

4.1.3 *Extracción mediante maceración y cuantificación de fenoles*

La extracción mediante maceración en frío es muy factible, ya que no se necesitó de un equipo sofisticado para lograr el cometido, simplemente se tomó en cuenta el uso de materiales y recipientes adecuados donde pueda mantenerse una temperatura adecuada y estable, y con los que se pueda evitar el ingreso de la luz, con el fin de que no ocurra cambios indeseables. Sin embargo, fue necesario el uso de grandes cantidades de material vegetal seco y de disolvente. Uno de los principales inconvenientes que se pudo constatar es que esta técnica requiere de tiempos muy superiores a las técnicas de ultrasonido y soxhlet, ya que se necesitó algunos días para conseguir la extracción deseada. Cabe mencionar que fue necesario la filtración del extracto una vez completados los días de macerado. Algo importante a tomar en cuenta, tal como indica (Tituaña, 2013) es que mediante el método de maceración se obtiene una extracción incompleta, por lo que sería conveniente realizar una segunda maceración usando la torta de filtración.

Tabla 16

Tabla resumen de concentraciones de fenoles expresados en mg/100 g del extracto de hojas mezcladas y senescentes en el día uno y día dos de maceración.

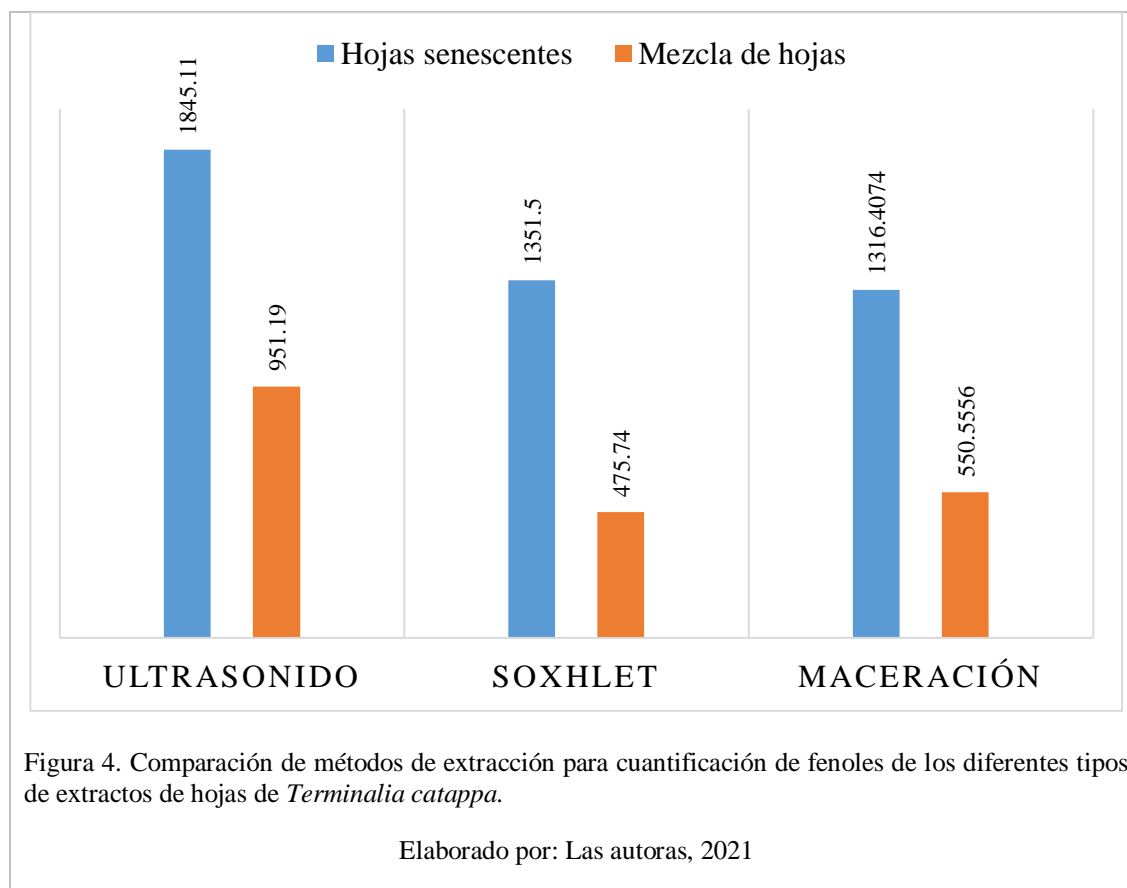
Día	Tipo de extracto	Media \pm Desv. estándar	p-valor
1	Mezcla	480,46 \pm 79,87	0,0010
	Senescentes	1316,41 \pm 150,17	
2	Mezcla	550,56 \pm 27,26	<0,0001
	Senescentes	1277,26 \pm 53,28	

Elaborado por: Las autoras, 2021

En la tabla 16, es posible constatar los resultados después de que se sometió a las hojas mezcladas y senescentes al método de maceración durante dos días, obteniendo de esta forma el extracto, que después fue medido mediante el ensayo de Folin Ciocalteu, con el cual pudimos obtener las absorbancias necesarias para calcular la concentración de ambas muestras, las cuales fueron medidas por triplicado en cada día. En dicha tabla es posible deducir que se mantuvo una estabilidad en el lapso de las 48 horas, ya que los valores de la media son similares. Por medio de la evaluación de los resultados alcanzados, es posible inferir que los valores de las filas inferiores, correspondiente al día dos de maceración, presentó los mejores resultados ya que se obtuvo una media alta y una desviación estándar baja, así como también se constató que existen valores atípicos. De igual manera se pudo deducir que en el segundo día, el extracto de hojas mezcladas presenta una mayor concentración, lo que no ocurre con las hojas senescentes, esto puede deberse a diversos factores, entre algunos de ellos puede ser el tiempo y cambio de temperatura ya que como menciona (Klimczak et al., 2007) ambos factores son de gran importancia ya que pueden afectar el contenido total de polifenoles en muestras medidas mediante el ensayo de Folin Ciocalteu.

Mediante la prueba de Shapiro-Wilks y de Levene se pudo comprobar que los datos poseen tanto normalidad como homogeneidad, con lo cual pudimos interpretar que los datos son paramétricos por lo que fue indispensable utilizar la prueba t para dos muestras, donde obtuvimos los resultados del p-valor. Estos resultados corresponden a una comparación entre el extracto de hojas mezcladas y el extracto de hojas senescentes de *T. catappa* en el primer y segundo día de maceración. Con respecto a los resultados del primer día de macerado, se obtuvo un p-valor menor al límite de 0,05 con lo que se rechaza la hipótesis nula infiriendo que hay una diferencia significativa entre ambos extractos. De igual manera en el segundo día de macerado se evidenció un p-valor menor a 0,05 por lo que se interpretó que, rechazando la

hipótesis nula y aceptando la hipótesis alternativa, existe una diferencia significativa entre ambos extractos de igual forma que sucedió con los resultados del primer día de maceración.



Observando la figura 4, se puede concluir que el mejor método de extracción para las hojas de *Terminalia catappa* es el ultrasonido, utilizando sonicación por 120 minutos a una concentración de 70:30 etanol:agua para senescentes; y por 120 minutos de sonicación a una concentración de 50:50 etanol:agua para la mezcla de hojas.

El mejor método de extracción es la maceración por su facilidad de implementación para trabajar con mayores volúmenes, en comparación con el soxhlet y el ultrasonido, esto concuerda con la información expuesta en Volf, Ignat, Neamtu, & Popa, (2014).

4.2 Tamizaje fitoquímico

Tabla 17

Resultados del tamizaje fitoquímico de la maceración de los extractos etanólicos de hojas verdes y senescentes del almendro (*Terminalia catappa*).

Metabolito	Ensayo	Resultados	
		Extracto etanólico	
		Hojas verdes y senescentes	Hojas senescentes
Alcaloides libres	Dragendorff	-	-
Taninos y fenoles	Cloruro Férrico	+++ (Pirogalotánicos)	+++ (Pirogalotánicos)
Flavonoides	Shinoda	+++	+++

Elaborado por: Las autoras, 2021

(+++)
Alto contenido del metabolito secundario

(++)
Contenido leve del metabolito secundario

(+)
Bajo contenido del metabolito secundario

(-)
Ausencia del metabolito secundario

En ninguno de los extractos existe presencia de alcaloides libres puesto que en ninguno de los tubos hubo opalescencia/turbidez. Estos resultados concuerdan con la información brindada en Bikanga, y otros, (2019).

En el ensayo del cloruro férrico, que determina la existencia de taninos y fenoles, tanto para la mezcla de hojas como para las hojas senescentes, existe alto contenido de los metabolitos secundarios. De la misma forma para el ensayo de Shinoda que determina la presencia de flavonoides: en los dos extractos hay alto contenido de estos metabolitos secundarios. Estos resultados coinciden con los expuestos en Rabiú, (2013).

Todos los resultados se pueden observar en el anexo 1.

4.3 Cuantificación de flavonoides totales por el método de cloruro de aluminio

Tabla 18

Cuantificación de la concentración de flavonoides totales, expresada en mg/g en hojas senescentes de *Terminalia catappa*.

Senescentes	Promedio	Desv. St.	mg/g (flavonoides)
1	2,70	0,01	4,20
2	2,71		
3	2,70		

Elaborado por: Las autoras, 2021

Para la cuantificación de flavonoides de hojas senescentes de *Terminalia catappa*, se utilizó el extracto macerado con concentración del 50:50 en alcohol y agua, y se hicieron tres repeticiones del ensayo.

El contenido de flavonoides total se expresa como mg de quercetina por gramo de muestra seca (Oyeleye, Adebayo, Ogunsuyi, Dada, & Oboh, 2018).

El resultado presentado en la tabla 18 es menor al obtenido en Oyeleye, Adebayo, Ogunsuyi, Dada, & Oboh, (2018), donde expusieron un valor de $7,80 \pm 1,32$ para su contenido de flavonoides. Estos resultados podrían sugerir que las especies encontradas en el país de la investigación citada (Nigeria) presentan mayor cantidad de flavonoides que las de Ecuador. A pesar de Annegowda, (2010) manejar tres diferentes muestras, todas fueron recolectadas en Malasia, y una de ellas presentó resultados de $9,34 \pm 1,77$. Esto reafirma que el contenido de flavonoides se encuentra influenciado por el lugar de recolección.

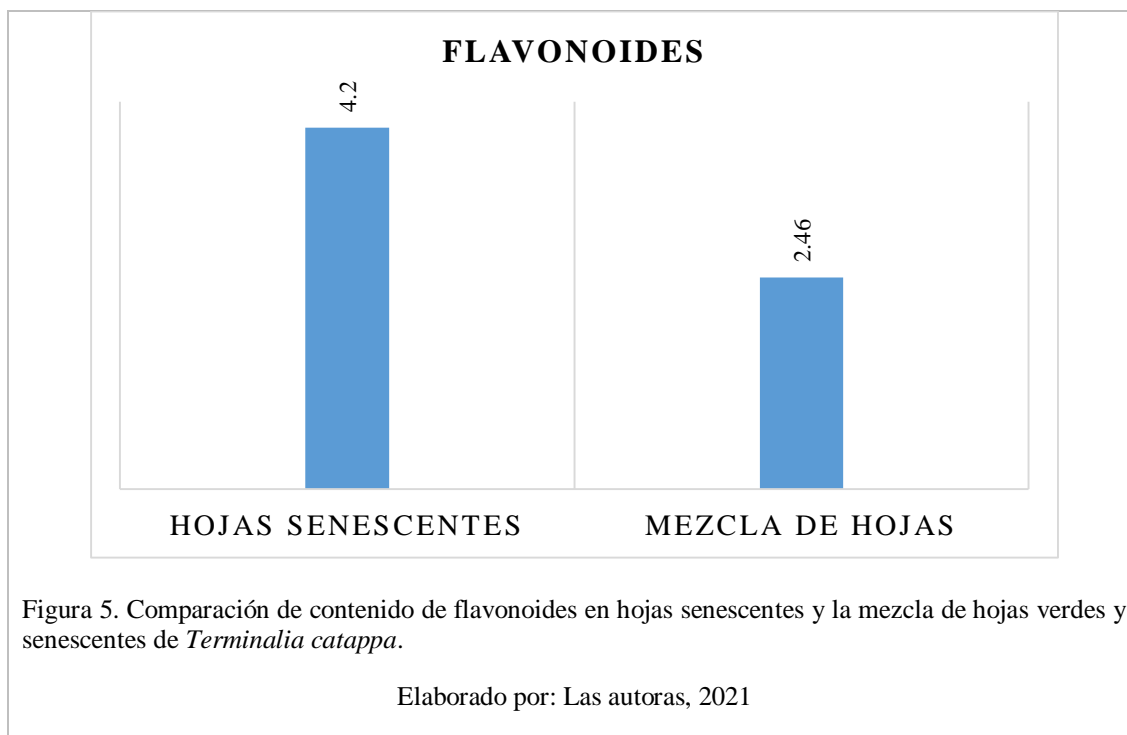
Tabla 19

Cuantificación de la concentración de flavonoides totales, expresada en mg/g en mezcla de hojas verdes y hojas senescentes de *Terminalia catappa*.

Mezcla	Promedio	Desv. Est.	mg/g (flavonoides)
1	1,8601	0,39	2,46
2	1,9470		
3	1,5515		

Elaborado por: Las autoras, 2021

En comparación con el resultado obtenido en la tabla de hojas senescentes (tabla 18), la mezcla de hojas analizada presenta menor cantidad de flavonoides que la muestra de hojas senescentes. Estos resultados se pueden confirmar con lo expuesto en Seema, Meeta, Meenakshi, & Manjushree, (2015), donde menciona que las hojas senescentes de *Terminalia catappa* presentan mayor cantidad de fitoconstituyentes que las hojas nuevas.



En la figura 5 se observa una comparación del contenido de flavonoides en las hojas senescentes y en la mezcla de hojas de *Terminalia catappa*. En diversas fuentes existe una variedad de estudios sobre compuestos fenólicos y la presencia de flavonoides en vegetales, en todos se coincide con una variabilidad en su contenido ya que depende de la muestra utilizada, de los solventes y del método de extracción; estos procedimientos presentan metodologías diversas que resultan en valores diferentes.

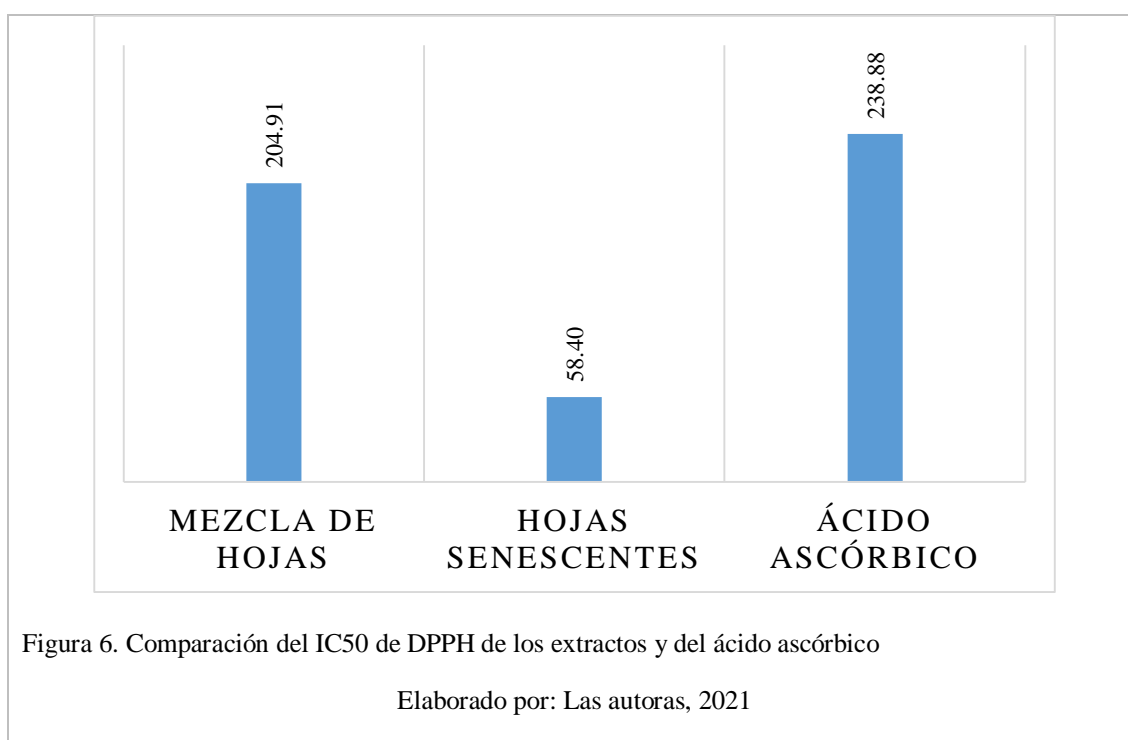
Las dos muestras de hojas utilizadas en el estudio presentan menor cantidad de flavonoides en comparación con los valores obtenidos de fenoles (figura 3). Esto quiere decir que existen muchos más compuestos fenólicos en las hojas, debido a que los flavonoides están integrados en estos en las plantas (Martín, 2018). Dichos resultados concuerdan con los de Annegowda, (2010) donde obtuvieron mayor cantidad de fenoles ($338,09 \pm 4,26$) que de flavonoides ($50,77 \pm 0,93$).

4.4 Determinación de la actividad antioxidante

DPPH

Las hojas senescentes de *Terminalia catappa* presentan más actividad antioxidante que la mezcla de hojas verdes y senescentes.

La actividad radical DPPH de hojas senescentes dio un resultado IC₅₀ de 58,40 ug/mL, mientras que la mezcla de hojas dio como resultado IC₅₀ de 204,91 ug/mL,



El valor que se obtuvo de IC₅₀ para la vitamina C es de 238,88.

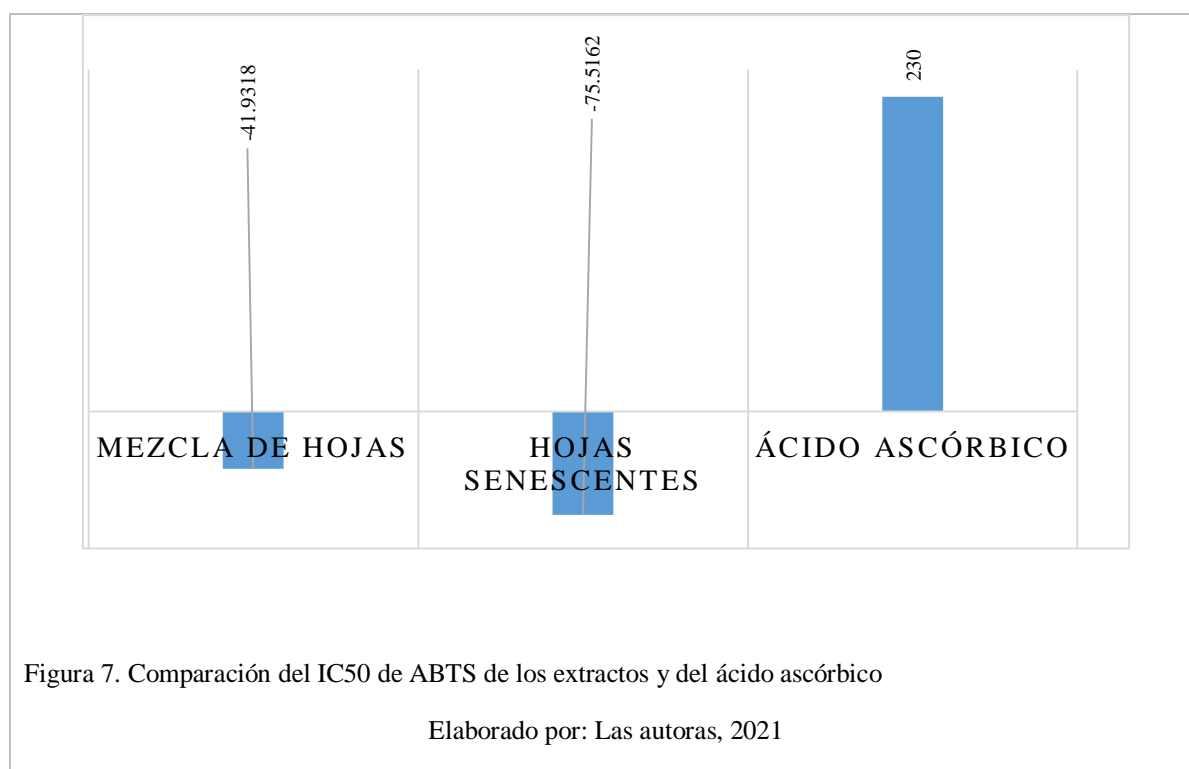
El IC₅₀ del extracto etanólico de *Terminalia catappa* de la mezcla de las hojas es menor al valor que se obtuvo de la vitamina C, por lo que se demuestra que la mezcla de hojas verdes y senescentes presenta menor capacidad antioxidante que el ácido ascórbico.

El extracto de las hojas senescentes dio un valor de 58,40 (valor mucho menor que el obtenido del ácido ascórbico). Es decir, este extracto posee una importante capacidad antioxidante.

ABTS

Las hojas senescentes como la mezcla de hojas verdes y senescentes de *Terminalia catappa* tienen valores negativos como resultados.

La lectura de la actividad antioxidante ABTS del extracto de la mezcla de hojas de *Terminalia catappa* dio como resultado IC₅₀ de -41,93 ug/mL, mientras que la lectura de la actividad antioxidante ABTS del extracto de las hojas senescentes de *Terminalia catappa* dio como resultado IC₅₀ de -75,51 ug/mL.



Estos resultados negativos podrían sugerir, como se menciona en Oluwatomide & Jide, (2020), una actividad pre-oxidante a niveles de concentración particulares y también una potente capacidad de eliminación.

Las diferencias en los resultados del método de DPPH y del método ABTS se deben a que diferentes radicales tienen diferentes potenciales antioxidantes cuando reaccionan con compuestos fenólicos (Sascha, 2016). Es decir, ambos radicales pueden resolverse de manera diferente, su tamaño molecular es diferente: mientras que el DPPH es un radical estabilizado por sí mismo, el radical ABTS debe formarse inicialmente. Esta diferencia de resultados también podría ser ocasionada por diferentes afinidades contra otros compuestos que están presentes en las muestras (Sascha, 2016).

De igual manera, en Espinosa, Bravo, Herrera, Ramos, & Espinosa, (2012) se menciona que los flavonoides, en altas concentraciones, actúan como pre-oxidantes. Entre los compuestos que ocasionan estas reacciones está el kaempferol, flavonoide presente en las hojas de *Terminalia catappa*, que ocasiona que la producción de ATP sea inhibida en la mitocondria (Valdameri, 2008).

4.5 Identificación de flavonoides por cromatografía de capa fina (TLC)

La corrida cromatográfica de los extractos de hojas senescentes (tres puntos del lado izquierdo) y hojas mezcladas (tres puntos en el lado derecho) de *Terminalia catappa* observada en la cámara de luz UV a 245 nm y a 366 nm, identificó la existencia de 9 flavonoides en hojas senescentes y 5 flavonoides en hojas mezcladas, como se presenta en la figura 8.

Placa TLC de *Terminalia catappa*

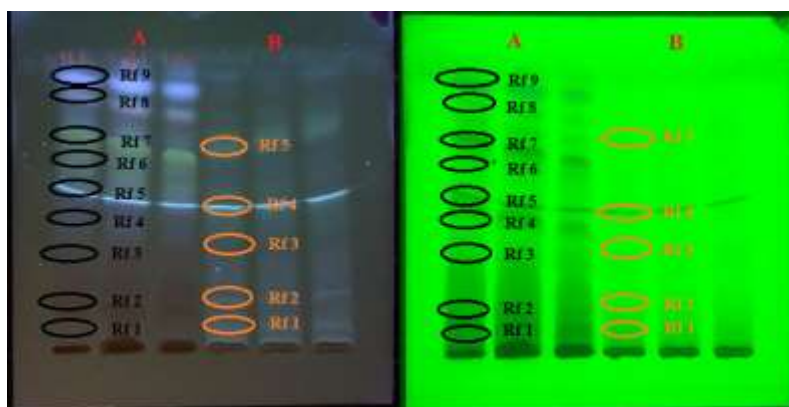


Figura 8. Placa TLC de extracto de hojas senescentes (A) y hojas mezcladas (B) de *Terminalia catappa*, observada a 245 nm y a 366 nm.

Elaborado por: Las autoras, 2021.

En la tabla 20 se detallan los valores de Rf resultantes de extracto de hojas senescentes y en la tabla 21 del extracto de hojas mezcladas y la fluorescencia emitida tanto a 245 nm como a 366 nm.

Tabla 20

Resultados de la corrida cromatográfica expresados en valores de Rf del extracto de hojas senescentes de *Terminalia catappa*.

Fracción	Rf	UV 245 nm	UV 366 nm
Rf 1	0,03	-	Negro
Rf 2	0,13	-	Plomo
Rf 3	0,25	-	Plomo
Rf 4	0,40	Fluorescencia azul	Plomo

Rf 5	0,44	Fluorescencia azul	Negro
Rf 6	0,54	Fluorescencia verde	Plomo
Rf 7	0,61	Fluorescencia verde	Plomo
Rf 8	0,71	Fluorescencia azul	Plomo
Rf 9	0,77	Fluorescencia azul	Plomo

Elaborado por: Autoras, 2021.

Tabla 21

Resultados de la corrida cromatográfica expresados en valores de Rf del extracto de hojas mezcladas de *Terminalia catappa*.

Fracción	Rf	UV 245 nm	UV 366 nm
Rf 1	0,06	Fluorescencia azul	Plomo
Rf 2	0,15	Fluorescencia azul	Plomo
Rf 3	0,27	-	Plomo
Rf 4	0,44	Fluorescencia azul	Negro
Rf 5	0,60	Fluorescencia verde	Plomo

Elaborado por: Las autoras, 2021.

Como se indica en las tablas 20 y 21, los Rfs demuestran la presencia de varias moléculas de flavonoides dentro de los extractos de *Terminalia. catappa*. Existen varios estudios donde realizan este ensayo, y donde se ha podido observar semejanzas en cuanto a los Rfs obtenidos, sin embargo, no se presentan los flavonoides específicos a los que corresponde cada valor. A pesar de esto por medio del estudio realizado por Minsakorn et al., (2021) se puede asegurar

que unos de los flavonoides presentes en esta especie e identificados mediante TLC es la rutina (quercetin-3-rutinósido).

Placa TLC revelada con DPPH

Mediante el uso de una solución de DPPH como revelador se puede observar que las fracciones resultantes con mayor coloración e intensidad tienen mejor capacidad antioxidante.

Placa TLC con DPPH de *Terminalia catappa*.

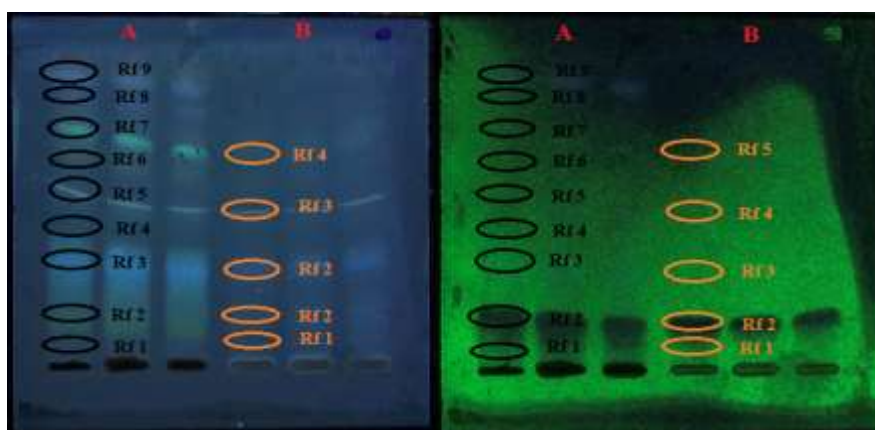


Figura 9. Placa TLC con DPPH de extracto de hojas senescentes (A) y hojas mezcladas (B) de *Terminalia catappa*, observada a 245 nm y a 366 nm.

Elaborado por: Las autoras, 2021.

En la tabla 22 se detallan los valores de Rf resultantes utilizando como revelador solución de DPPH en TLC de extracto de hojas senescentes y en la tabla 23 del extracto de hojas mezcladas y la fluorescencia emitida tanto a 245 nm como a 366 nm.

Tabla 22

Resultados de la corrida cromatográfica revelada con DPPH, expresados en valores de Rf del extracto de hojas senescentes de *Terminalia catappa*.

Fracción	Rf	UV 245 nm	UV 366 nm
Rf 1	0,06	.	Plomo
Rf 2	0,13	Fluorescencia verde	Negro
Rf 3	0,25	Fluorescencia azul	-
Rf 4	0,37	-	-
Rf 5	0,40	Fluorescencia verde	-
Rf 6	0,54	-	Plomo
Rf 7	0,66	Fluorescencia verde	Plomo
Rf 8	0,72	Fluorescencia azul	Plomo
Rf 9	0,75	Fluorescencia azul	Plomo

Elaborado por: Las autoras, 2021.

Tabla 23

Resultados de la corrida cromatográfica revelada con DPPH, expresados en valores de Rf del extracto de hojas mezcladas de *Terminalia catappa*.

Fracción	Rf	UV 245 nm	UV 366 nm
Rf 1	0,06	Fluorescencia	Plomo
Rf 2	0,14	Fluorescencia	Negro

Rf 3	0,28	Fluorescencia	-
Rf 4	0,41	Fluorescencia	-
Rf 5	0,57	Fluorescencia	Plomo

Elaborado por: Las autoras, 2021.

Mediante la aplicación del DPPH como revelador pudo identificarse fácilmente que los extractos tanto de hojas mezcladas como de hojas senescentes de *Terminalia catappa*, contenían una buena cantidad de compuestos con actividad antioxidante, lo cual confirmó los resultados obtenidos en el espectrómetro utilizando como método los ensayos de DPPH y ABTS.

4.6 Actividad inhibitoria por medio de la técnica de microdilución en caldo.

Para la técnica de microdilución se utilizaron los extractos preparados por medio de la maceración, en el caso de las hojas mezcladas con una proporción de 50:50 y hojas senescentes de 70:30 agua etanol. Los cuales después de ser macerados durante dos días fueron llevados al rotavapor con el fin de evaporar el etanol para que este no influya en los resultados inhibitorios.

Cabe mencionar que únicamente se tomaron las concentraciones que presentaron los resultados con mayor significación en cada una de las microplacas. Dichas concentraciones se presentaron en los pocillos correspondiente a la dilución 1:32 hasta la 1:2048, de dónde se tomaron tanto los datos de los controles positivos (ampicilina y terpineol) y de los extractos de hojas mezcladas y hojas senescentes, con lo cual se puede establecer una comparación entre los mismos con el fin de determinar la mejor concentración en dónde se produce un efecto inhibitorio, así como evaluar la actividad antibacteriana de los extractos de *Terminalia catappa* a comparación de la actividad antibiótica.

Tabla 24

Datos de las diferentes concentraciones y absorbancias obtenidas en la microplaca.

Dilución	Muestra	Concentración mg/mL	Absorbancias			Media	D. E
1:32	Ampicilina	1,28	0,27	0,16	0,27	0,23	0,06
	Terpineol	1,28	0,22	0,09	0,35	0,22	0,13
	Mezcla	17,20	0,37	0,42	0,39	0,39	0,02
	Senescentes	39,91	0,35	0,25	0,23	0,28	0,06
1:64	Ampicilina	0,64	0,38	0,25	0,43	0,35	0,10
	Terpineol	0,64	0,24	0,29	0,53	0,35	0,16
	Mezcla	8,60	0,92	0,75	1,01	0,89	0,13
	Senescentes	19,96	0,25	0,43	0,34	0,34	0,09
1:128	Ampicilina	0,32	0,38	0,41	0,47	0,42	0,05
	Terpineol	0,32	0,34	0,62	1,01	0,66	0,34
	Mezcla	4,30	1,34	1,33	1,33	1,33	0,01
	Senescentes	9,98	0,27	0,45	0,34	0,35	0,09
1:256	Ampicilina	0,16	0,75	0,41	0,63	0,60	0,17
	Terpineol	0,16	0,44	0,94	1,20	0,86	0,38
	Mezcla	2,15	1,56	1,46	1,46	1,49	0,06
	Senescentes	4,99	0,36	0,61	0,50	0,49	0,13
1:512	Ampicilina	0,08	1,26	0,64	1,19	1,03	0,34
	Terpineol	0,08	0,71	1,23	1,19	1,05	0,29
	Mezcla	1,08	1,27	1,47	1,45	1,40	0,11
	Senescentes	2,49	0,52	1,01	1,12	0,88	0,32

1:1024	Ampicilina	0,04	0,73	1,28	0,75	0,92	0,32
	Terpineol	0,04	0,70	1,32	0,93	0,98	0,32
	Mezcla	0,54	1,25	1,34	1,26	1,28	0,05
	Senescentes	1,25	0,92	1,21	1,33	1,15	0,21
1:2048	Ampicilina	0,02	1,13	0,90	0,77	0,93	0,18
	Terpineol	0,02	1,03	1,10	0,84	0,99	0,13
	Mezcla	0,27	1,05	1,23	1,04	1,11	0,11
	Senescentes	0,62	0,54	1,31	1,28	1,04	0,44

Elaborado por: Las autoras, 2021.

En la tabla 24 se presentan los datos de absorbancia, media aritmética y desviación estándar, tanto de los controles positivos como de los extractos de hoja de *Terminalia catappa*, en la cual es posible identificar como mejores resultados inhibitorios a los valores más bajos de absorbancia.

Se realizó la prueba de Kruskal Wallis en cada dilución, obteniéndose que solamente en la dilución 1:128, correspondiente a una concentración de 4,30 mg/mL en el caso de la mezcla de hojas y 9,98 mg/mL en hojas senescentes, se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos, señalando que el menor valor de absorbancia corresponde al extracto de hojas senescentes.

Los resultados de la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis muestra que para todas las otras series de diluciones menores, no existen diferencias significativas entre los valores de absorbancia entre los controles positivos y el extracto de hojas senescentes ($p>0,05$) por lo que hay una actividad equivalente entre las concentraciones ensayadas. Mientras que en las diluciones mayores no se consideró necesario realizar un análisis ya que según los datos obtenidos a diluciones superiores de 1:128 no se obtuvo un efecto inhibitorio de la bacteria.

Mediante el análisis de los datos se pudo evidenciar que la concentración de los antibióticos que mayor eficacia tuvo frente a la bacteria *E. tarda*, fue de 1,283 mg/mL de ampicilina, la cual es equivalente a la actividad de hojas senescentes de concentración 39,91 mg/mL. Por lo tanto, se pudo concluir que sí bien el extracto de hojas senescentes de *Terminalia catappa* tiene una capacidad inhibitoria similar a la del antibiótico, se precisa una concentración más alta de este extracto, a fin de obtener un resultado inhibitorio tan eficaz como el de un químico. Así como en el trabajo realizado por Abiodun et al., (2015) también se pudo determinar que existe un efecto antibacterial de una fracción del tallo de *Terminalia catappa* contra *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*, lo que demuestra que esta planta tiene una capacidad antibacterial eficaz contra algunas especies de bacterias.

En el caso de nuestra investigación pudimos aseverar con éxito que las hojas senescentes de *Terminalia catappa* presentan un poder inhibitorio mayor a comparación del extracto de hojas mezcladas con verdes y senescentes, ya que existe una mayor cantidad de polifenoles en hojas senescentes.

Conclusiones

En las hojas senescentes se obtuvo la mayor cantidad de fenoles (1845,11 mg/g) con extracción asistida con ultrasonido por 120 minutos, con un solvente de 30 % de etanol y 70 % agua. A pesar que en la mezcla de hojas el mejor método y tiempo de extracción fue el mismo que en las hojas senescentes, se obtienen mejores resultados (953,78 mg/g) con un solvente de 50 % de etanol y 50 % de agua.

Las hojas senescentes poseen mayor cantidad de fenoles y flavonoides que la mezcla de hojas, independientemente del método de extracción seleccionado. El uso de hojas senescentes de *Terminalia catappa* como tratamiento natural y reemplazo a antibióticos en la producción piscícola en India y Tailandia es verificable.

Por medio de tamizaje fitoquímico se determina la existencia de taninos, fenoles y flavonoides en los extractos de hojas senescentes y en los extractos de la mezcla de hojas verdes y senescentes de *Terminalia catappa*.

Las hojas senescentes y la mezcla de hojas verdes y senescentes poseen, de acuerdo al método DPPH, mayor capacidad antioxidante que el ácido ascórbico, sin embargo, se obtuvieron resultados negativos en el método ABTS, demostrando una actividad preoxidante y también una potente capacidad de eliminación en el extracto, ocasionando diferencias en los métodos por su reacción con los varios compuestos fenólicos.

Las hojas senescentes de *Terminalia catappa* y la mezcla de hojas verdes y senescentes poseen una buena capacidad inhibitoria sobre *Edwardsiella tarda* a una concentración de 39,91 mg/mL y 17,20 mg/mL respectivamente, sin embargo, las hojas senescentes tienen actividad antimicrobiana mayor que la mezcla de hojas, confirmando así que las hojas maduras de este árbol tienen mayor actividad antimicrobiana que sus hojas verdes.

Recomendaciones

Probar los extractos de hojas senescentes de *Terminalia catappa*, que son objetivo de estudio con posible potencial terapéutico para la acuicultura por su actividad antioxidante e inhibitoria confirmada.

Considerar que *Edwarsiella tarda* es muy sensible a los cambios externos que pudieran darse durante la manipulación para su estudio, cualquier variación de este tipo, podría ocasionar una inhibición sobre ella.

Referencias bibliográficas

- Abiodun, O. O., Sood, S., Osiyemi, O. A., Agnihotri, V. K., Gulati, A., Ajaiyeoba, E. O., & Singh, B. (2015). In vitro antimicrobial activity of crude ethanol extracts and fractions of *Terminalia catappa* and *Vitex doniana*. *African Journal of Medicine and Medical Sciences*, 44(1), 21–26.
- Ballesteros, J. (2018). *Manual de procedimiento de prácticas: laboratorio de ciencias de la vida*. 1–50.
- Buenaño, J., & León, G. (2016). *UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL Buenaño García José Raúl*. <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/17971/1/401-1198> - Obtención de un alelopático para uso veterinario.pdf
- Bujan, N., Mohammed, H., Toranzo, A., & Magarinos, B. (2014). Estudio Filogenético De *Edwardsiella tarda* Mediante Polimorfismo De La Longitud De Los Fragmentos Amplificados (AFLP). *Taxon*, July, 1–3.
- CDC; OMS. (2009). Manual para las pruebas de identificación y suceptibilidad antimicrobiana. *Medicina y Laboratorio*, 15(11–12), 549–587.
- Chong, R. (2011). *Alimentos ricos en flavonoides y sus beneficios a la salud*. <http://repositorio.unsm.edu.pe/bitstream/handle/11458/3564/FIAI> - Rodrigo Grey Chong Tuesta.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Choudhury, T. G., Gupta, S. K., & Samchetsabam, G. (2017). Edwardsiellosis : An Emerging Disease in Indian Aquaculture. *Aquaculture Times*, 3(2), 38–40.
- Delange, D. M., Luisa, C., & Rico, M. (2016). Identification of polyphenolic acids in the methanolic extract from *Terminalia catappa* Linn leaves. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 21(2), 223–233. <http://scielo.sld.cu>
- Duarte, J., & Pérez-Vizcaíno, F. (2015). Cardiovascular protection by flavonoids. Pharmacokinetic mystery | Protección cardiovascular con flavonoides. Enigma

- farmacocinético. *Ars Pharmaceutica*, 56(4), 193–200.
- Duarte Trujillo, A. S., Jiménez Forero, J. A., Pineda Insuasti, J. A., González Trujillo, C. A., & García Juárez, M. (2020). Extracción de sustancias bioactivas de *Pleurotus ostreatus* (Pleurotaceae) por maceración dinámica. *Acta Biológica Colombiana*, 25(1), 61–74.
<https://doi.org/10.15446/abc.v25n1.72409>
- Estrada-Reyes, R., Ubaldo-Suárez, D., & Araujo-Escalona, A. G. (2012). Los flavonoides y el Sistema Nervioso Central. *Los Flavonoides y El Sistema Nervioso Central*, 35(5), 375–384.
- Gallegos-Zurita, M. (2016). Las plantas medicinales: principal alternativa para el cuidado de la salud, en la población rural de Babahoyo. *An Fac Med*, 77(4).
<https://doi.org/10.15381/anales.v77i4.12647>
- Granados-Sánchez, D., Ruíz-Puga, P., & Barrera-Escorcía, H. (2008). Ecología de la herbivoría. *Revista Chapingo, Serie Ciencias Forestales y Del Ambiente*, 14(1), 51–63.
- Guerra, D., Valdez, C., Orozco, D., & Fuentes, H. (2016). *Guía para la identificación de especies de árboles y arbustos comunes en el agropaisaje de Guatemala*.
<https://books.google.com.ec/books?id=rD0fDgAAQBAJ&pg=PA64&dq=terminalia+catappa+descripcion+botanica&hl=es-419&sa=X&ved=2ahUKEwj4kN7G2fLvAhV3RTABHe4XAxMQ6AEwAnoECAIQAg#v=onepage&q&f=false>
- Hevira, L., Zilfa, Rahmayeni, Ighalo, J. O., Aziz, H., & Zein, R. (2021). *Terminalia catappa* shell as low-cost biosorbent for the removal of methylene blue from aqueous solutions. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, xxxx.
<https://doi.org/10.1016/j.jiec.2021.01.028>
- Hildebert, W., Bauer, R., Melchart, D., Gen-Xiao, P., & Staudinger, A. (2011). *Chromatographic Fingerprint Analysis of Herbal Medicines: Thin-layer and ...* - Google

Libros.

- Klimczak, I., Małecka, M., Szlachta, M., & Gliszczyńska-Świgło, A. (2007). Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(3–4), 313–322. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.02.012>
- Mariaca, C. J., & Uribe, P. (2016). *Oxidación y antioxidantes : hechos y controversias*. 3, 162–173.
- Oyeleye, S. I., Adebayo, A. A., Ogunsuyi, O. B., Dada, F. A., & Oboh, G. (2018). Phenolic profile and Enzyme Inhibitory activities of Almond (*Terminalia catappa*) leaf and Stem bark. *International Journal of Food Properties*, 20(3), S2810–S2821. <https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1375945>
- Peñarrieta, J. M., Tejeda, L., Mollinedo, P., Vila, J. L., & Bravo, J. A. (2014). [Compuestos fenólicos y su presencia en alimentos]. Phenolic Compounds in Food. *Revista Boliviana De Química*, 31, 68–81. <https://www.redalyc.org/pdf/4263/426339682006.pdf>
- Rodriguez-Maturino, A., Troncoso-Rojas, R., Sánchez-Estrada, A., González-Mendoza, D., Ruiz-Sanchez, E., Zamora-Bustillos, R., Ceceña-Duran, C., Grimaldo-Juarez, O., & Aviles-Marin, M. (2015). Efecto antifúngico de extractos fenólicos y de carotenoides de chiltepín (*Capsicum annum* var. *glabriusculum*) en *Alternaria alternata* and *Fusarium oxysporum*. *Revista Argentina de Microbiología*, 47(1), 72–77. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2014.12.005>
- Santamaría, C., Martín González, A., & Astorga, F. (2015). Extractos vegetales, aplicación para la reducción del estrés. *NutriNews*, 75–80. <https://nutricionanimal.info/download/0315-ena-WEB.pdf>
- Sepúlveda-Vázquez, J., Torres-Acosta, J. F., Sandoval-Castro, C. A., Martínez-Puc, J. F., &

Chan-Pérez, J. I. (2018). La importancia de los metabolitos secundarios en el control de nematodos gastrointestinales en ovinos con énfasis en Yucatán, México. *Journal of the Selva Andina Animal Science*, 5(2), 79–95.

<https://doi.org/10.36610/j.jsaas.2018.050200079>

Valencia, M. (2018). *MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE LA SEMILLA DE MORINGA (Moringa oleífera)*. 53(9), 1689–1699.


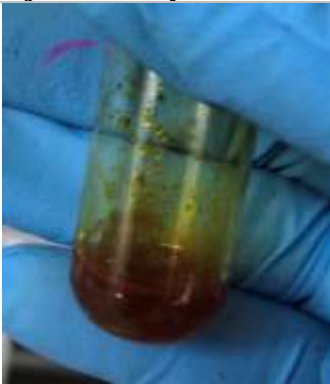

<http://recursosbiblio.url.edu.gt/tesisjrzd/2018/06/17/Valencia-Maylin.pdf>

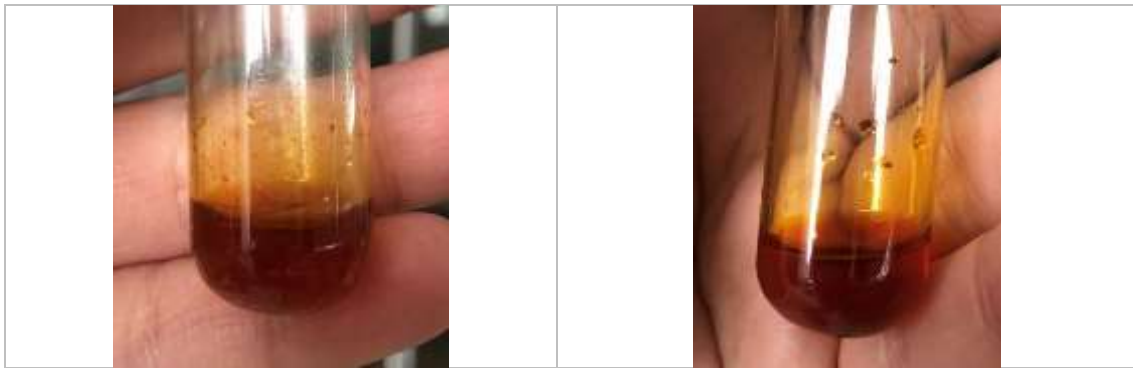
Verjan, N., Iregui, C. A., & Hirono, I. (2012). Edwardsiellosis, common and novel manifestations of the disease: A review. *Revista Colombiana de Ciencia Animal*, 5(1), 82–90.

Yakubu, Y., Talba, A. M., Chong, C. M., Ismail, I. S., & Shaari, K. (2020). Effect of *Terminalia catappa* methanol leaf extract on nonspecific innate immune responses and disease resistance of red hybrid tilapia against *Streptococcus agalactiae*. *Aquaculture Reports*, 18(August), 100555. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100555>

Anexos

Anexo 1. Tamizaje Fitoquímico. Pruebas Positivas

Ensayo Dragendorff	
	
Hojas verdes y senescentes	Hojas senescentes
	
	

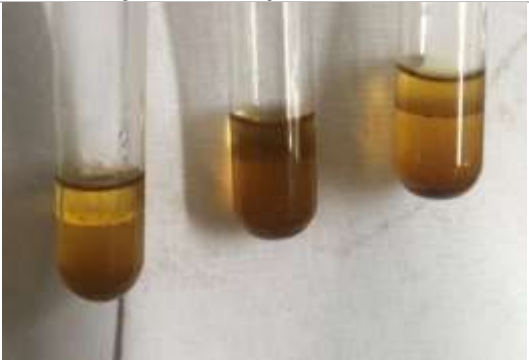



Ensayo Cloruro Férrico

Hojas verdes y senescentes

Hojas senescentes



Ensayo Shinoda	
Hojas verdes y senescentes	Hojas senescentes
	

Anexo 2. Resultados del programa estadístico InfoStat

Cuantificación de fenoles en hojas senescentes de *Terminalia catappa*.

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	12,75	27	0,47	7,51	<0,0001
Tiempo	9,91	3	3,30	52,52	<0,0001
Tramientos	1,56	6	0,26	4,13	0,0017
Tiempo*Tramientos	1,28	18	0,07	1,13	0,3489
Error	3,52	56	0,06		
Total	16,27	83			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,20493

Error: 0,0629 gl: 56

Tiempo Medias n E.E.

120	1,34	21	0,05	A
90	0,90	21	0,05	B
45	0,66	21	0,05	C
30	0,41	21	0,05	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,31309

Error: 0,0629 gl: 56

Tramientos Medias n E.E.

E6	1,04	12	0,07	A
E1	0,94	12	0,07	A B
E5	0,87	12	0,07	A B
E3	0,86	12	0,07	A B
E2	0,81	12	0,07	A B
E4	0,64	12	0,07	B
E7	0,64	12	0,07	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Cuantificación de fenoles en mezcla de hojas de *Terminalia catappa*.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Absorbancia	84	0,89	0,84	19,03

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	3,98	27	0,15	17,34	<0,0001
Tiempo	2,43	3	0,81	95,16	<0,0001
Tratamientos	0,86	6	0,14	16,80	<0,0001
Tiempo*Tratamientos	0,70	18	0,04	4,55	<0,0001
Error	0,48	56	0,01		
Total	4,46	83			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,07535

Error: 0,0085 gl: 56

Tiempo	Medias	n	E.E.	
120	0,68	21	0,02	A
90	0,59	21	0,02	B
45	0,42	21	0,02	C
30	0,24	21	0,02	D

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,11512

Error: 0,0085 gl: 56

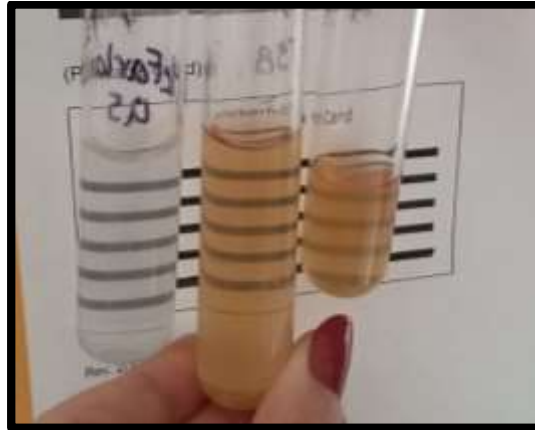
Tratamientos	Medias	n	E.E.	
E2	0,57	12	0,03	A
E4	0,56	12	0,03	A
E3	0,55	12	0,03	A
E5	0,54	12	0,03	A
E6	0,51	12	0,03	A
E7	0,34	12	0,03	B
E1	0,31	12	0,03	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Microdilución en caldo

Anexo 3. Comparación del inóculo con la prueba de Mc Farland.

Prueba de Mc Farland



Anexo 5. Comparación del inóculo con la prueba de Mc Farland.

Elaborado por: Las autoras, 2021